

ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN

ABTEILUNG FÜR PNEUMOLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. J. C. VIRCHOW

ZUR REGULATION DES
NEUROTROPHINS BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)
BEI PATIENTEN MIT STABILER CHRONISCH OBSTRUKTIVER
LUNGENERKRANKUNG (COPD)

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON URS WÜRTEMBERGER, GEBOREN IN FREIBURG IM BREISGAU

urn:nbn:de:gbv:28-diss2017-0044-6

DATUM DER EINREICHUNG : 25.04.2016

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 17.01.2017

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. MAREK LOMMATZSCH, ABTEILUNG FÜR PNEUMOLOGIE,
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. ARMIN BRAUN, FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR TOXI-
KOLOGIE UND EXPERIMENTELLE MEDIZIN, BEREICH FÜR PRÄKLINISCHE PRÜFUNG, HANNO-
VER

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. UWE WALTER, KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROLO-
GIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Diagnosestellung und Schweregrad	2
1.1.3	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	3
1.1.4	Pathologie und Pathophysiologie der COPD	5
1.2	Systemische Erkrankung und systemische Biomarker	7
1.3	BDNF bei obstruktiven Atemwegserkrankungen	8
1.4	Fragestellung	9
II.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	10
2.2	Studiendesign	11
2.3	Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben.....	14
2.4	Bodyplethysmographie.....	14
2.5	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
2.6	Statistik.....	18
III.	ERGEBNISSE.....	19
3.1	Charakteristika der Studienteilnehmer	19
3.2	BDNF-Konzentration im Serum.....	22
3.3	BDNF-Konzentration in den Thrombozyten	24
3.4	TGF- β 1-Konzentration im Serum.....	26
3.5	Serotoninkonzentration im Serum.....	28
3.6	Korrelation der Serumkonzentrationen von BDNF, TGF- β 1 und Serotonin.....	30
3.7	Korrelationen von BDNF, TGF- β 1 und Serotonin mit der Lungenfunktion.....	32
IV.	DISKUSSION.....	35
4.1	Neurotrophine bei obstruktiven Atemwegserkrankungen	35
4.2	BDNF und langwirksame Beta-Sympathomimetikas (LABA).....	36
4.3	Andere medikamentöse Interaktionen	37
4.4	Korrelation von BDNF-Konzentration mit dem Schweregrad der COPD	38
4.5	Die Rolle und Regulation von TGF- β 1 bei der COPD.....	39
4.6	Serotonin und COPD	40

4.7	Unterschiede und Gemeinsamkeiten von COPD und Asthma.....	41
4.8	Schlussfolgerung.....	42
V.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	43
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	44
VII.	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	55
IX.	LEBENS LAUF	57
X.	DANKSAGUNG	58
XI.	THESEN	59

I. EINLEITUNG

1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.1.1 Definition:

Mit der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) wird eine häufige, vermeidbare und behandelbare Erkrankung beschrieben, welche sich durch eine andauernde, für gewöhnlich fortschreitende Atemflussbehinderung auszeichnet. Die „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)“ wurde 1997 -in Zusammenarbeit mit dem National Heart, Lung, and Blood Institute, den National Institutes of Health sowie der Weltgesundheitsorganisation (WHO)- initiiert mit dem Ziel der Steigerung der Bekanntheit sowie Verbesserung von Prävention und Therapie der COPD (www.goldcopd.org).

Patienten mit COPD zeigen charakteristische Symptome, welche die Leistungsfähigkeit und die Lebensqualität der Patienten deutlich beeinträchtigen können. Am häufigsten wurde bei etwa $\frac{3}{4}$ der Patienten über Atemnot sowie in einer weiteren Studie Auswurf berichtet, neben häufig genannten Beschwerden wie chronischer Husten, Giemen sowie ein Engegefühl in der Brust („chest tightness“). Die Beschwerden werden meist morgens als stärker empfunden. Zudem wurde von mehr als 60% der Patienten eine saisonale Variabilität der respiratorischen Symptome berichtet[1, 2].

Die Erkrankung ist mit einer chronisch entzündlichen Immunantwort in der Lunge und den Atemwegen auf schädliche Partikel oder Gase vergesellschaftet. Zur Schwere der Erkrankung des jeweiligen Patienten tragen Exazerbationen und Komorbiditäten bei (Update der GOLD-Empfehlungen 2014).

Die im Volksmund oftmals als Raucherlunge bezeichnete Erkrankung wird fälschlicherweise oft mit dem Lungenemphysem oder der chronischen Bronchitis gleichgesetzt. Diesbezüglich gilt, dass der Begriff des Emphysems eine reine Beschreibung einer Überblähung der Lunge ist (die auch bei anderen Erkrankungen auftreten kann) und die chronische Bronchitis für die COPD keinesfalls spezifisch ist, da diese auch bei Rauchern und Nichtrauchern ohne Atemwegsobstruktion auftreten kann.

1.1.2 Diagnosestellung und Schweregrad

Das für die Diagnosestellung der COPD notwendige Kriterium ist der anhaltend eingeschränkte Tiffeneau-Wert, der Quotient aus FEV₁ (forciertes Expirationsvolumen der ersten Sekunde) und VC (Vitalkapazität) in Zusammenschau mit einer typischen Anamnese (ein eingeschränkter Tiffeneau-Index kann auch bei einem schweren Asthma bronchiale auftreten). Ein gemessener Tiffeneau-Wert – auch nach Einnahme eines Bronchodilatators - von weniger als 0.7 bestätigt die COPD-Diagnose, wenngleich dies mit der aktuellen Empfehlung bezüglich der Definition der Atemwegsobstruktion kollidiert. Quanjer et al. definieren den Tiffeneau-Grenzwert als LLN (lower limit of normal), welches abhängig ist von Alter, Geschlecht, Körpergröße und Ethnizität. Aus Gründen der Praktikabilität wird aber weiterhin der generelle Grenzwert von 0.7 seitens der GOLD-Autoren empfohlen.[3]

Bezüglich des Schweregrads der COPD wird üblicherweise die alte spirometrische GOLD-Einteilung oder die neue multifaktorielle (mehrdimensionale) GOLD-Einteilung (2014) verwendet.

Spirometrische Stadien*	GOLD-	Tiffeneau-Index	FEV ₁ in %-Soll
GOLD 1 (leicht)		FEV ₁ /FVC < 70%	FEV ₁ ≥ 80%
GOLD 2 (mittel)		FEV ₁ /FVC < 70%	50% ≤ FEV ₁ < 80%
GOLD 3 (schwer)		FEV ₁ /FVC < 70%	30% ≤ FEV ₁ < 50%
GOLD 4 (sehr schwer)		FEV ₁ /FVC < 70%	FEV ₁ < 30%

Tab. 1.1 Schweregradeinteilung der COPD mittels FEV₁-Werten(% vom Soll) nach GOLD 2004.

* Nach Gabe eines Bronchodilatators

Die zur Diagnosestellung der COPD benötigten lungenfunktionellen Parameter, die allein zur alten GOLD-Klassifikation genügten (Tab. 1.1), müssen nicht zwingend mit der vom Patienten berichteten individuellen Lebensqualität sowie den Symptomen des Patienten übereinstimmen[4]. Dies führte zu einer Erweiterung der GOLD-Klassifikation (Update der GOLD-Empfehlungen 2011), die den Ausprägungsgrad der Symptome und die jährliche Exazerbationshäufigkeit berücksichtigen (Abb. 1.1)

GOLD-Stadien anhand der Lungenfunktion		4 3 2 1	C Hohes Risiko, wenig Symptome	D Hohes Risiko, mehr Symptome	≥ 2 Oder ≥ 1 , zum Krankenhausaufenthalt fñhrend	Exazerbationen im letzten Jahr		
			A Niedriges Risiko, wenig Symptome	B Niedriges Risiko, mehr Symptome			1, nicht zu Krankenhausaufenthalt fñhrend	
					0			
			CAT < 10 mMRC 0 - 1				CAT ≥ 10 mMRC ≥ 2	
			Symptome Luftnot					

Abb. 1.1 Schweregradeinteilung der COPD nach Lungenfunktion entsprechend der GOLD-Klassifikation, CAT-Score, mMRC und Exazerbationsrisiko. Abbildung angefertigt in Anlehnung an Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Revised 2011.

Der mMRC-Fragebogen graduiert die Luftnot und erlaubt ergänzend zur GOLD-Klassifikation den Schweregrad der COPD zu bestimmen. Eine Korrelation zwischen FEV1-Werten und mMRC-Score fand sich hierbei nicht[5]. Der mMRC-Score, alternativ der COPD-Assessment Score (CAT) welcher die Einschätzung und Verlaufsbeurteilung der COPD ermöglicht[6], soll in Kombination mit der jährlichen Exazerbationshäufigkeit und dem GOLD-Stadium die Einteilung der Patienten in die Gruppen A-D eine genauere Prognose zulassen, prospektive Daten liegen jedoch noch nicht vor.

1.1.3 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die COPD ist weltweit einer der Hauptursachen von steigender Mortalität und Morbidität. 1990 war es die 6. häufigste Todesursache, 2000 die 4. häufigste und wird laut WHO-Schätzungen voraussichtlich im Jahr 2020 die 3. häufigste Todesursache weltweit sein[7]. Die Prävalenz der nach den alten spirometrischen Kriterien ermittelten COPD-Stadien GOLD 2-4 betrug in eine weltweiten Studie durchschnittlich 10.1%[8], mit großen geographischen Unterschieden; so variierte sie für Frauen mit GOLD-Stadium 2 von 5,1% in Guangzhou bis 16,7% in Kapstadt; für Männer fanden sich höhere Varianzen von 8,5% in Reykjavik bis 22,2% in Kapstadt[9].

Der wichtigste Risikofaktor der COPD ist inhalatives Zigarettenrauchen; bis zu 25% aller Raucher entwickeln in ihrem Leben eine COPD[10]. Für die Progredienz der Erkrankung sind ein niederer BMI (Body Mass Index) als auch das CT-morphologische Ausmaß des Emphysems mit ausschlaggebend[11].

Neben dem klassischen Zigarettenrauchen führt auch Tabakkonsum in Form von Zigarren- oder Pfeife-Rauchen vermehrt zu COPD, aber weniger ausgeprägt als bei Zigarettenkonsum. Ein synergistischer Marijuanakonsum führt ebenfalls vermehrt zu COPD, während dies nicht für Marijuana allein gezeigt werden konnte[12].

Auch Passiv-Rauchen steigert das Risiko unter Nie-Rauchern an COPD zu erkranken und ist bei stärkerer Exposition (z.B. zu Hause und am Arbeitsplatz) sogar vergleichbar mit leichtem Zigarettenkonsum, vor allem bei Jüngeren[13].

In Entwicklungsländern ist zunehmend die Exposition gegenüber Innenraumschadstoffen ("indoor air pollution") beim Heizen und Kochen durch die Verbrennung von Biobrennstoffen für die COPD-Entstehung verantwortlich[14, 15].

Auch die berufsbedingte Exposition gegenüber Rauch, Stäuben und Gasen erhöht das COPD-Risiko[16].

Der bekannteste genetische Risikofaktor für COPD ist der hereditäre α 1-Antitrypsinmangel, der bei bis zu 3% der COPD-Patienten vorliegt und in Kombination mit Rauchen das Risiko auf ein panlobuläres Emphysem erhöht[17].

Auch wenn inhalatives Zigarettenrauchen der Hauptrisikofaktor für COPD ist, waren in Studien etwa $\frac{1}{4}$ der COPD-Patienten im Stadium GOLD 2-4 Nieraucher[18].

Die sogenannten „childhood disadvantage factors“ (Asthma bei den Eltern oder in der Kindheit, mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft, sowie gehäufte Atemwegsinfektionen in der Kindheit) erhöhen das COPD-Risiko [19, 20].

Ärztlich diagnostiziertes Asthma führt zu einem deutlich höheren Risiko im weiteren Verlauf des Lebens an COPD zu erkranken[21]. Bislang ist jedoch unklar, inwieweit es sich bei diesen Patienten wirklich um COPD handelt oder um eine schwere Form von Asthma. Jüngere Daten bestätigen jedenfalls, dass eine COPD nicht nur auf einen verstärkten Abfall der Lungenfunktion im Erwachsenenalter, sondern auch auf dem Nichterreichen der maximalen Lungenfunktion im jungen Erwachsenenalter beruhen kann[22].

1.1.4 Pathologie und Pathophysiologie der COPD

Wesentliche Eckpfeiler der COPD-Pathophysiologie sind eine chronische Entzündung der kleinen Atemwege und eine chronische, nur teilweise reversible Obstruktion der Atemwege. Folge dieser chronischen Entzündung und Obstruktion der kleinen Atemwege ist das Lungenemphysem, welches in unterschiedlicher Ausprägung bei Patienten mit COPD auftritt.

Chronische Entzündung und Immunmechanismen:

Brusselle et al. beschreiben die COPD als Ausdruck abnormal gesteigerter, entzündlicher Immunreaktionen der Lungen auf toxische Partikel und Gase[23].

Charakteristikum dafür ist die Entwicklung einer chronischen Entzündung in den Lungen als Folge einer Exposition gegenüber inhaliertem Zigarettenrauch, die bei Rauchern ohne chronische Lungenkrankheit so nicht nachzuweisen ist. Verstärkend tragen eine genetische Veranlagung und oxidativer Stress zur Entzündungsreaktion bei [24]. Eine gestörte Immunregulation im Blut bei COPD-Patienten kann zu extrapulmonalen Manifestation der Erkrankung beitragen[25]. Inhalierte Schadstoffe wie z.B. Zigarettenrauch treffen zunächst auf eine Epithelbarriere der Atemwege, welche durch mukoziliäre Clearance Schadstoffe aus der Lunge entfernen kann, unterstützt durch das angeborene und erworbene Immunsystem[26-28].

Die Immunregulation lässt sich in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem einteilen.

Die Aktivierung angeborener Immunmechanismen erfolgt durch die Erkennung verschiedener Mikroben, z.B. anhand verschiedener mikrobenspezifischer "Pathogen-associated-molecular patterns" (PAMPs), durch "Pattern recognition receptors" (PRRs) auf Alveolarmakrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen. Zigarettenrauch aktiviert entweder direkt oder durch Verletzung von epithelialen Zellen, die "Damage-associated molecular-patterns" (DAMPs) freisetzen, verschiedene PRRs. Die DAMPs werden auch durch toxische Substanzen, oxidativen Stress, Infektionen und Gewebshypoxie induziert.[29] Mit Fortschreiten der COPD zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression costimulatorischer Moleküle durch die verschiedenen pulmonalen dendritischen Zellen[30]. Diese verbinden angeborene und erworbene Immunmechanismen.

Bei COPD sind die CD8⁺ T-Zellen im Alveolarraum wie auch in den Atemwegen die überwiegenden T-Zellen. Ihre Anzahl steigt mit dem Schweregrad der Atemwegsob-

struktion und des Emphysems[31, 32]. Aktiviert setzen sie proteolytische Enzyme frei, welche für Zelltod infolge Apoptose oder Nekrose verantwortlich sind[33]. Auch die CD4+-T-Zellen sind bei Rauchern mit COPD erhöht; Th1-Zellen bewirken durch die Produktion von Interferon γ eine Vermehrung entzündlicher Zellen in den Lungen, Th17-Zellen regulieren die Gewebsentzündung durch Freisetzen von Interleukinen[34, 35].

B-Zellen sind bei COPD in den großen Atemwegen erhöht, bei fortgeschrittenen Stadien auch in Lymphfollikeln um die kleinen Atemwege[36] und im Lungenparenchym nachweisbar[37]. Die Rolle der B-Zellen in der COPD-Pathogenese sind möglicherweise gegensätzlich, zum Einen können sie einer mikrobiellen Besiedlung entgegenwirken, zum Anderen könne sie potenziell schädlich sein, im Sinne einer Autoimmunreaktion gegen Lungengewebsantigene[32]. Gestützt wird diese Annahme durch den Nachweis verschiedener Autoantikörper bei COPD-Subgruppen, z.B. Anti-Elastin-Antikörper[38], welcher jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte[39]. Zudem existieren Hinweise, dass die pulmonalen Lymphfollikel bei COPD-Patienten vermehrt B-Zellen-aktivierende Faktoren ("BAFF") exprimieren, welche in einer selbstverstärkenden Rückkopplung das Überleben der B-Zellen sowie die Ausbreitung der Lymphfollikel fördern[40, 41].

Obstruktion der kleinen Atemwege

Der wesentliche Anteil der Atemwegsobstruktion wird in den so genannten kleinen Atemwegen (kleiner 2 mm Durchmesser) generiert[42]. Es ist belegt, dass sich hier strukturelle Veränderungen in den kleinen Atemwegen bei allen Rauchern finden, unabhängig vom Vorliegen einer COPD[36, 43, 44]. Bei der COPD kommt es in den kleinen Atemwegen zu einem Remodeling, welches sich durch eine Volumenzunahme des Gewebes der Atemwegswände, z.B. Epithel und glatte Muskulatur äußert[36]. Dies führt zu einer teilweise fixierter Obstruktion der Atemwege[45].

Lungenemphysem

Das Lungenemphysem ist zu einem Teil Folge der Obstruktions-bedingten Ausatem-Behinderung ("air-trapping"), pathogenetisch kommen jedoch weitere Faktoren hinzu. So kommt es auch zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Anti-Protease, welches zur Zerstörung und Überblähung des Lungenparenchyms beiträgt. Dabei wird die Extrazellulärmatrix durch proteolytische Prozesse, infolge eines Über-

gewicht der Serin-Proteasen neutrophile Elastase und Proteinase 3, zerstört[46]. Letztere können auch per se zu einer Hypersekretion von Mukus führen[47]. Neben angeborenem α 1-Antitrypsinmangel (homo- oder heterozygot) kann auch die Inaktivierung endogener Antiproteasen infolge von Exposition zu Zigarettenrauch oder Rauch von Biobrennstoffen zur entzündungsbedingten Emphysementwicklung führen[48]. Chronische Rauchexposition stimuliert ebenfalls Alveolarmakrophagen und den Einstrom von Neutrophilen in die Lunge sowie von CD8+-T-Zellen. Diese setzen neben oben genannten Proteasen auch die Matrix Metalloproteinasen 9 und 12 (MMPs) und Kathepsine frei, die sich gegenseitig verstärken können. MMPs sind zudem in der Lage α 1-Antitrypsin direkt abzubauen[49]. Funktionell wird zuletzt wegen des entstandenen Lungenemphysems der maximale Ausatemstrom durch die verringerte elastische Rückstellkraft der Lunge weiter reduziert [50].

1.2 Systemische Erkrankung und systemische Biomarker

Patienten mit fortgeschrittener COPD zeigen häufig verschiedene Komorbiditäten, die für ihre Prognose und Belastbarkeit im Alltag wichtig sind[51]. So ist ein eingeschränkter FEV1-Wert bereits ein unabhängiger Risikofaktor für einen Myokardinfarkt, unabhängig von Alter, Geschlecht und Zigarettenkonsum[52]. Patienten mit einer COPD im spirometrischen Stadium GOLD 3-4 zeigten ein deutlich erhöhtes Risiko für Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen[53]. Ein gehäuftes Auftreten von Osteoporose oder Osteopenie wurde in nahezu 70% bei einer von Jorgensen untersuchten COPD-Population nachgewiesen, wobei eine Glukokortikoidtherapie hierfür nicht allein als verantwortlich gesehen wurde[54]. Eine muskuläre Schwäche, insbesondere aufgrund der Atrophie der Skelettmuskelfasertypen IIa/IIb[55], findet sich ebenfalls gehäuft bei der COPD. Das sogenannte "Muscle Wasting" hat Auswirkungen auf die Lungenfunktion, Alltagsbelastbarkeit und Mortalität[56]. Bei fortgeschrittener COPD findet sich in 17-33% der Fälle eine Anämie, während eine hypoxämisch bedingte Polyzythämie sich nur in 6% findet.[57-59]. In klinisch stabilen COPD-Patienten zeigt sich in 19-42% der Fälle eine behandlungsbedürftige Depression, depressive Symptome sogar bei bis zu 80% aller COPD-Patienten[60, 61].

Dieses zusätzliche Auftreten extra-pulmonaler Erkrankungen bei COPD lässt sich teilweise als Ausdruck eines systemischen Entzündungsprozesses deuten. Auch wäre ein Übertreten der in der Lunge ablaufenden pathologischen Prozesse auf die an-

deren Organe denkbar.[62, 63] Hinweise für derartig systemische Entzündungen sind erhöhte Werte für Zytokine, Akute-Phase-Proteine und Leukozyten, welche bereits 2003, 2004 und 2007 an kleinen Patientenpopulationen beschrieben wurden [62, 64, 65]. 2012 wurde diese Hinweise durch eine große Studie an mehr als 1700 COPD-Patienten- die in die ECLIPSE-Studie[66] eingeschlossen waren- durch Agusti et al bestätigt. Er zeigte bei einem Großteil der COPD-Patienten signifikant erhöhte, systemischer Biomarker wie z.B. Leukozyten, CRP, IL-6, IL-8, Fibrinogen und TNF- α . Zirka 1/3 der untersuchten Patienten zeigten keine erhöhten Werte. Patienten mit konstant erhöhten, systemischen Entzündungswerten zeigen unabhängig von der Lungenfunktion eine erhöhte Mortalität und Exazerbationshäufigkeit[67].

Eine Analyse von 92 verschiedenen Biomarkern im Serum von COPD-Patienten zeigte BDNF (brain-derived neurotrophic factor) neben dem CD40-Liganden und EGF (epidermal growth factor) als eines der drei am stärksten überexprimierten Proteine[68]. 2007 zeigte eine Studie von Pinto-Plata et al., dass BDNF in einem Panel von 24 Biomarkern bei COPD-Patienten am stärksten mit einer reduzierten FEV1 korrelierte[69]. Eine systematische Untersuchung zur Regulation von BDNF bei der COPD fehlte jedoch bislang.

1.3 BDNF bei obstruktiven Atemwegserkrankungen

Der Begriff Neurotrophin bezeichnet eine Gruppe von strukturell ähnlichen dimeren Proteinen, welche wesentliche regulatorische Funktionen im Rahmen von neuronalen Wachstums- und Überlebensprozessen während der Embryogenese, aber auch im adulten Organismus ausüben[70]. Zur Gruppe der Neurotrophine gehören bislang neben BDNF der Nerve growth factor (NGF), Neurotrophin 3 und Neurotrophin 4/5 sowie NT-6 und NT-7[71]. Neurotrophine lassen sich auch in unterschiedlichen Strukturen des Respirationstraktes nachweisen, wie z.B. im Bronchialepithel, in der glatten Muskulatur, im Gefäßendothel und in Fibroblasten[72, 73].

Die Bedeutung des Neurotrophins BDNF in der Pathogenese des Asthma bronchiales und unterer Atemwegsinfektionen wurde bereits von Lommatzsch und Kollegen nachgewiesen. BDNF ist ein bedeutsamer Mediator bei der verstärkten neuronalen Reagibilität der Atemwege[74]. BDNF wird physiologischerweise in den glatten Muskelzellen der Atemwege sowie im Epithel der Atemwege exprimiert[72, 75]. Eine verstärkte BDNF-Sekretion führt zu bronchialer Hyperreagibilität in Asthma-

Modellen[76]. Die systemischen BDNF-Spiegel korrelieren mit dem Ausmaß der bronchialen Hyperreagibilität bei Asthma[77-79]. Bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale fanden sich im Serum und im Plasma erhöhte BDNF-Konzentrationen, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Zudem korrelierten sie mit dem Ausmaß der Atemwegsobstruktion und der bronchialen Hyperreagibilität. Für TGF- β 1, welches wie BDNF in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert wird, fand sich kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen zwischen Patienten mit Asthma und Kontrollen[79].

Die Thrombozyten stellen große Speicher für BDNF dar, welches aktiv aufgenommen und in den alpha-Granula gespeichert wird[80, 81]. Zudem spielen die Thrombozyten bei Asthma-typischen Veränderungen wie bronchialer Hyperreagibilität, Bronchokonstriktion, Atemwegsentzündung sowie Atemwegsremodeling eine aktive Rolle[82]. Ursache der deutlichen Differenz zwischen hohen BDNF-Serumkonzentrationen und niedrigen BDNF-Plasmakonzentrationen ist die Degranulation der Thrombozyten im Rahmen der Serumentstehung[80, 81].

Neben dem Neurotrophin BDNF wird auch TGF- β 1 in Thrombozyten gespeichert[83], welches unter anderem für die Pathogenese von Fibrosierungen und Gewebsumbauprozessen eine Rolle spielt[84, 85].

Fragestellung

BDNF ist ein wichtiger systemischer Biomarker bei Patienten mit Asthma, der mit dem Ausmaß der Atemwegsdysfunktion korreliert. Obwohl es auch bei der COPD erste Hinweise auf eine systemische Erhöhung von BDNF aus Chip-basierten Screening-Untersuchungen gibt, ist die genaue Regulation von BDNF und der Bezug zur Erkrankungsschwere bislang unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, erstmals die genaue Regulation von systemischem BDNF bei Patienten mit stabiler COPD zu erforschen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Es wurden Patienten rekrutiert, die sich im Zuge einer elektiven Rehabilitationsmaßnahme in der Allergie- und Asthmaklinik Bad Lippspringe und der Klinik Martinusquelle Bad Lippspringe befanden.

Rekrutierungskriterien waren:

1. Alter mindestens 18 Jahre
2. Die durch einen Arzt gestellte Diagnose einer COPD

Patienten, die die Rekrutierungskriterien erfüllt haben, wurden nach ausführlicher Anamnese und körperlicher Untersuchung in der Lungenfunktionsabteilung der Allergie- und Asthmaklinik Bad Lippspringe einer Bodyplethysmographie unterzogen.

Des Weiteren wurden folgende Parameter erfasst:

Körpergröße, Körpergewicht, Body-Mass-Index, Raucherstatus (pack years), Alter, Allergien, jegliche Begleiterkrankungen sowie die aktuelle Medikation.

Nach Rekrutierung galten als Einschlusskriterium:

1. FEV1/VC < 70% nach Inhalation eines kurzwirksamen Bronchodilatators
2. Ein Anstieg der FEV1 von < 15% nach Inhalation eines kurzwirksamen Bronchodilatators
3. Abstand zum letzten Prednisolonstoß von mindestens 4 Wochen

Ausschlusskriterien waren:

1. Jegliche maligne Erkrankungen
2. Zeichen einer akuten Infektion
3. Zeichen einer akuten Exazerbation der COPD
4. Einnahme von Thienopyridinen (Clopidogrel, Prasugrel)

Für die Kontrollgruppe wurden ebenfalls Patienten rekrutiert, welche sich in elektiven Rehabilitationsmaßnahmen befanden, und ähnliche Begleiterkrankungen zeigten. Exemplarisch hierfür seien arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, kardiale Erkrankungen sowie Adipositas genannt. Es durften keine COPD sowie andere Atemwegserkrankungen vorhanden sein. In Anbetracht der Raucheranamnese der

COPD-Patienten wurde als Rekrutierungskriterium für die Kontrollgruppe eine Mindestanzahl von 20 pack years vorausgesetzt. Wie bei der COPD-Gruppe führte eine Einnahme von Thienopyridinen zum Studienausschluss.

Zusammengefasst die Einschlusskriterien der Kontroll-Gruppe:

1. Alter mindestens 18 Jahre
2. Pack years > 20
3. Ähnliche Begleiterkrankungen wie in der COPD-Gruppe z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas.

Ausschlusskriterien:

1. Einnahme von Thienopyridinen
2. Jegliche malignen Erkrankungen
3. Zeichen einer akuten Infektion
4. Weitere akute wie chronische Atemwegserkrankungen sowie ein FEV1/VC < 70%
5. Systemische Autoimmunerkrankungen

2.2 Studiendesign

Bei Vorliegen aller Rekrutierungs- und Einschlusskriterien und Nichtvorliegen sämtlicher Ausschlusskriterien wurde den Patienten mittels eines Aufklärungsbogens (Abbildung 2.1) und im Gespräch Inhalt und Durchführung der Studie erläutert. Nach Unterzeichnung der Aufklärung sowie der Einverständniserklärung (Abbildung 2.2) wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen. Am Studientag erfolgte nochmal eine kurze Anamnese und körperliche Untersuchung. Eine Rücktritt von der Studie war jederzeit ohne Angabe von Gründen möglich. Die Studie wurde im Vorfeld der Untersuchungen durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock geprüft und ohne Einwände zugelassen.

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

die Untersuchungen dieser Studie erfolgen im Rahmen von Forschungsarbeiten über sogenannte Neurotrophine, Nervenwachstumsfaktoren, die Bestandteile sowohl des Immunsystems als auch des zentralen und peripheren Nervensystems darstellen. Die Studie soll erforschen, ob diese Eiweiße bei Patienten mit einer Chronisch – obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) im Vergleich zu Gesunden verändert sind. Die Ergebnisse dieser Studie könnten in Zukunft zur Entwicklung neuer Therapieverfahren der Erkrankung beitragen.

Die Studie wird von zwei Ärzten (Dr. Paul Stoll und Priv.-Doz. Dr. Marek Lommatzsch) sowie einem Doktoranden der Medizin (Herr Urs Würtemberger) betreut. Sie beinhaltet eine einmalige Untersuchung für einen Zeitraum von etwa 60 Minuten. Die Studie besteht aus den beiden Teilen einer venösen Blutentnahme und einer Lungenfunktionsuntersuchung („Bodyplethysmographie“). Alle Untersuchungen stellen Routineverfahren in pneumologischen Abteilungen dar. Die Blutentnahme beinhaltet die einmalige venöse Punktion und die Entnahme von etwa 25 ml Blut zur Analytik des Blutbildes und der oben genannten Nervenwachstumsfaktoren. Bei der Lungenfunktionsuntersuchung werden Sie gebeten, in einer Plexiglas-Kammer bestimmte Atemmanöver durchzuführen. Durch diese Untersuchung kann festgestellt werden, welche Leistungsfähigkeit Ihre Lunge besitzt. Die Lungenfunktionsuntersuchung dauert etwa 10 Minuten. Sämtliche während der Studie erhobenen Daten werden selbstverständlich streng vertraulich behandelt. Die gewonnenen Informationen unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Ein Rücktritt von Ihrer Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen erfolgen ohne dass Ihnen hieraus Nachteile erwachsen. Wir möchten Sie mit dieser Patienteninformation herzlich einladen, an der beschriebenen Studie teilzunehmen.

Dr. med. Paul Stoll

PD Dr. med. habil. Marek Lommatzsch

Urs Würtemberger

Abb. 2.1 Patienteninformationsblatt zur geplanten Studie.

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Studie: Charakterisierung von Neurotrophinen im peripheren Blut bei Patienten mit stabiler COPD

Ich wurde vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Studie mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Ich wurde über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken informiert. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme an dieser klinischen Studie freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann.

Mir wurde versichert, dass dabei die Grundsätze des Datenschutzes beachtet werden, d.h. meine personenbezogenen Daten vertraulich behandelt und nicht an andere Personen und Stellen weitergegeben werden. Ich erkläre mein Einverständnis für die wissenschaftliche Veröffentlichung der Forschungsergebnisse unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen. Ich habe eine Kopie der Probandeninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser klinischen Studie.

Unterschrift des Patienten

Ort, Datum

Abbildung 2.2 Einverständniserklärung.

2.3 Gewinnung und Verarbeitung der Blutproben

Material

Stauschlauch

Hautdesinfektion Octenisept

Handschuhe

Sterile Wattetupfer

Blutentnahmekanüle

Blutentnahmemonovetten

- 1x Monovette EDTA 2,7ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)

- 2x Monovette Serum 10ml ohne Additiva (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Am Morgen des Studientages wurden einmalig je ein EDTA-Röhrchen sowie 2 Serumröhrchen abgenommen zur Bestimmung des kleinen Blutbildes und zur Serumgewinnung. Die Blutentnahme erfolgte im Sitzen nach 2-minütiger Ruhezeit aus der Vena cubitalis.

Sofort nach Abnahme wurden die Serum-Röhrchen 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um eine vollständige Gerinnung sowie thrombozytäre Degranulation der Proben zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 2000 G bei Raumtemperatur.

Die Serumüberstände wurden mittels einer Pipette zu jeweils 500 µl in Eppendorf-Röhrchen aliquotiert, wobei sich je nach Überstand 5-6 Eppendorfröhrchen gewinnen ließen. Diese wurden bei -20°C tiefgefroren. Nach Abschluss des Studienzeitraumes wurden diese unter ständiger Kühlung mittels Trockeneis per Zug zur Auswertung in die Abteilung für Pneumologie der Uniklinik Rostock gebracht.

Die EDTA-Röhrchen wurden zur Blutbildbestimmung direkt in dem mit der Allergie- und Asthmaklinik sowie der Klinik Martinusquelle assoziierten Labor untersucht.

2.4 Bodyplethysmographie

Material

Ganzkörperbodyplethysmograph mit Auswertungssoftware (Fa. Viasys, Würzburg)

Mundstück und Nasenklemme (Fa. Viasys, Würzburg)

Lungenfunktionsprüfung

Diese Methode erlaubt mit hoher Sensitivität die Bestimmung des Atemwegswiderstandes sowie der statischen Lungenvolumina wie z.B. der Residualkapazität und

der totalen Lungenkapazität. Sie ermöglicht die momentan ausführlichste Möglichkeit zur Erfassung der Lungenfunktion und ist elementar bei der Diagnostik einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. Dies geschieht mittels physikalischer Gesetzmäßigkeiten, wonach das Produkt aus Druck und Volumen stets konstant ist. Daraus folgt dass eine gemessene Druckänderung Rückschlüsse auf das intrathorakale Gasvolumen ermöglicht. Der Patient sitzt in einer geschlossenen Kabine und atmet über ein Mundstück. Zur Atemstromstärkemessung ist er mit einem Pneumotachographen verbunden. Während des Atmens ändert sich das Körpervolumen und somit entstehen in der Kammer messbare Druckveränderungen. Diese ergeben ein Druck-Strömungsdiagramm, mithilfe dessen man Aussagen über das Verhalten des Strömungswiderstandes während des gesamten Atemzyklus treffen kann. Weiterer Bestandteil der Bodyplethysmographie ist die Spirometrie, welche mobilisierbare Lungenvolumina wie z.B. die FEV1 (das forcierte expiratorische Volumen in der ersten Sekunde der Ausatmung) oder den Atemspitzenfluss (Peak-Flow) bestimmt. Somit ermöglichen die Lungenfunktionsuntersuchung mittels Bodyplethysmograph eine umfassende Bestimmung der statischen und mobilisierbaren Lungenvolumina.

Zur Messung sitzt der Patient aufrecht in der Kabine des Bodyplethysmographen und wird mit dem Pneumotachographen verbunden. Mit einer Nasenklemme wird die Nase verschlossen. Da die Luft sich nach Schließen der Kabinentür erwärmt, sollte wegen eines möglichen Drifts des Signals einige Minuten gewartet werden, um dies auszugleichen. Der Patient soll ruhig ein- und ausatmen. Hierbei erfolgt zunächst die Bestimmung des Atemwegswiderstandes in Ruheatmung. Bei Erreichen der endexpiratorischen Atemruhelage wird das Atemrohr verschlossen. Durch Einatmung gegen diesen Widerstand wird das intrathorakale Gasvolumen gemessen. Darauf folgen die spirometrischen Messungen zur Bestimmung der Atemvolumina. Der Patient wird gebeten maximal auszuatmen, dann so tief wie möglich einzuatmen, und schließlich wieder maximal und so schnell wie möglich auszuatmen, gefolgt von einer normalen Einatmung.

2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Geräte und Materialien

Multichannel-Pipette (Eppendorf, Hamburg)

Pipette Research 100-1000ul (Eppendorf, Hamburg)

Pipette Research 20-200ul (Eppendorf, Hamburg)

Waschautomat Amerlite Washer (Amersham Buchler, Braunschweig)
Photometer Anthos ht III (Anthos Mikrosysteme, Krefeld)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R (Kendro Laboratory Products, Hanau)
Schüttler The Belly Dancer (Stovall Life Science, Greensboro, USA)
Rundbodenplatten , 96 Wells (Greiner microloan, Frickenhausen)
Pipettenspitzen blau 1000ul (Greiner BioOne, Frickenhausen)
Pipettenspitzen gelb 200ul (Greiner BioOne, Frickenhausen)
PP-Röhrchen 1,3ml (Greiner BioOne, Frickenhausen)
Reagent Reservoir Costar 50ml (Corning Life Sciences, Wiesbaden)
ELISA-Kit DuoSet (R&D Systems, Wiesbaden)
Bovines Serumalbumin BSA (Sigma, Hohenbrunn)
Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
Entwickler (R&D Systems)
Color Reagent A: H₂O₂; Color Reagent B: Tetramethylbenzidin

Lösungen

10 x PBS: 160,2 g NaCl +28,8 g Na₂HPO₄ + 4,03 g KCl +4,08 g KH₂PO₄
Aufgelöst in 2000 ml Aqua dest.
pH-Wert eingestellt auf 7,3 ; zum Gebrauch 1:10 verdünnt
Blockpuffer: PBS + 1% BSA + 5% Saccharose + 0,05% NaN₃
Reagent Diluent: PBS + 1% BSA
Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween 20
Stopp-Lösung: 2N H₂SO₄

Methode und Durchführung:

Der so genannte „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein Verfahren zur zuverlässigen Bestimmung von Protein-Stoffmengenkonzentrationen. Dem liegt die Bildung eines Komplexes aus dem gesuchten BDNF, Antikörpern und einem Enzym zugrunde, was zu einer enzymatischen Umsetzung des vorhandenen Substratgemisches führt. Die enzymatische Umsetzung bewirkt einen Farbumschlag, welcher sich nach photometrischer Bestimmung in die Konzentration des interessierenden BDNFs umrechnen lässt.

Der auf die Mikrotiterplatte aufgetragenen monoklonale Primärantikörper (Capture-Antibody) wird an diese fest gebunden. Die Probe mit dem interessierenden Protein

(Antigen) wird nun dazugegeben und eine Zeit lang inkubiert. Währenddessen bindet der Primärantikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Die Platte wird gewaschen damit ungebundene Bestandteil der Probe entfernt werden. Der nun hinzugefügte polyklonale Sekundärantikörper (Detection-Antibody) erkennt ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper und bindet mit einer seiner zwei Bindungsstellen ebenfalls an diesen Antigen-Antikörperkomplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Die andere noch freie Bindungsregion fixiert das nun hinzutretende Enzym Streptavidin-Peroxidase, welches in der Lage ist, Tetramethylbenzidin durch eine Redoxreaktion mit Wasserstoffperoxid in die oxidierte Form zu überführen. Diese Redoxreaktion resultiert in einem bläulich sichtbaren Farbumschlag. Durch Zugabe von Schwefelsäure entsteht ein Farbumschlag in den gelblichen Bereich, welcher in seiner Intensität quantitativ bestimmt werden kann und mit Hilfe der mitgeführten Standardreihen, mit bekannten absteigenden Konzentrationen in die Stoffmengenkonzentration des gesuchten BDNFs umgerechnet werden kann.

Die Primärantikörper wurden in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit jeweils 50ul pro Well auf die ELISA-Platte übertragen. Die mit Parafilm abgedeckten Platten wurden in Dunkelheit bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit Hilfe des Waschautomaten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen, welcher jedesmal vor Benutzung neu erstellt wurde. Im Anschluss daran erfolgte das Auftragen von 100ul Blockpuffer pro Well; die Platten wurden daraufhin in Dunkelheit und bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert und wiederum fünfmal gewaschen. Nach dem im Folgenden beschriebenen Schema wurde nun das Pipettieren der Probenlösungen vorgenommen: In die beiden oberen Reihen der Platte wurden in die ersten zehn Wells 50ul der Standardverdünnungsreihen pipettiert; die beiden letzten Vertiefungen erhielten lediglich 50ul Verdünnungslösung und dienten als Negativkontrolle und Blankwert. Die übrigen 72 Wells in den unteren 6 Reihen der Platte wurden durch jeweils 50ul der Probenlösungen belegt. Die Proteinkonzentration aller Proben wurde in Doppelbestimmung erfasst. Die Platten wurden mit Parafilm bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden pro Well 50ul des Sekundärantiköpers aufgetragen und mit Parafilm bedeckt, um dann für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer zu inkubieren, wonach die Platten dann wiederum fünfmal gewaschen wurden. Im Folgenden wurde dann die Meerrettich-Peroxidase-Stammlösung 1:200 mit Reagent Diluent verdünnt und mit

einem Volumen von 50ul pro Well appliziert. Daran schloss sich eine Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur von 20 Minuten Dauer an. Die im Verhältnis 1:1 gemischten Color Reagents A und B wurden nun mit einem Volumen von 50 ul pro Well auf die Platten aufgetragen und bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach circa 20 Minuten wurden 50 ul der 1 M Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion hinzu gegeben. Es erfolgte die sofortige Messung der optischen Dichten mit Hilfe des Anthos HT3 Readers bei 450 nm Wellenlänge und einem Referenzfilter bei 595 nm. Unter Verwendung der mitgeführten Standardreihen erfolgte die computer-gestützte Umrechnung der optischen Dichten in die entsprechenden Konzentrationen. Für die Messung von BDNF im Serum wurde Serum 1:50 in PBS verdünnt. Das Detektionslimit betrug 8 pg/ml.

Die Messungen von TGF- β 1 und Serotonin erfolgten im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universität Rostock. Die Serotoninbestimmung im Serum erfolgte mittels HPLC unter Nutzung eines kommerziell erhältlichen Reagenz-Systems (Chromosystems, München). TGF- β 1 wurde ebenfalls mittels ELISA bestimmt.

2.6 Statistik

Die Daten wurden mittels SPSS (Chicago, IL, USA) analysiert, wobei sich zeigte, dass bei den Ergebnissen die meisten Parameter nicht normalverteilt waren. Deshalb war es nötig, die Korrelationsanalysen mit dem Spearman-Korrelations-Koeffizienten durchzuführen. Die Parameter wurden als Medianwerte (Minimum – Maximum) dargestellt. Die Lungenfunktionsparameter und die BDNF-, TGF- β 1- und Serotoninkonzentrationen wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben verglichen. Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

III. ERGEBNISSE

3.1 Charakteristika der Studienteilnehmer:

Es wurden ursprünglich 67 Patienten mit einer ärztlich diagnostizierten sowie lungenfunktionell mithilfe einer Bodyplethysmographie bestätigten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung COPD für die Studie gewonnen. 4 Patienten mussten aufgrund bestehender Ausschlusskriterien ausgeschlossen werden, sodass letztendlich 63 Patienten (männlich: 39, weiblich: 24) eingeschlossen und ausgewertet werden konnten (Tab. 3.1). In der Tabelle 3.1. sind diese 63 Patienten als Gesamtgruppe aufgeführt und zusätzlich getrennt nach spirometrischen COPD-Schweregraden. Im spirometrischem Stadium II waren 22 Patienten (männlich: 12, weiblich: 10), im spirometrischem Stadium III 28 Patienten (männlich: 19, weiblich: 9) und im spirometrischem Stadium IV 13 Patienten (männlich: 8, weiblich: 5). Kein Patient konnte dem Stadium I zugeordnet werden.

Für die Kontrollgruppe wurden 20 Patienten rekrutiert, von denen 3 Patienten aufgrund bestehender Ausschlusskriterien ausgeschlossen werden mussten, sodass 17 Patienten (männlich: 12, weiblich: 5) in die Studienaushwertung eingeschlossen werden konnten (Tab.3.1).

	COPD				Kontrollen	p
	alle	GOLD 2	GOLD 3	GOLD 4		COPD (alle) vs. Kontrolle
	n = 63	n = 22	n = 28	n = 13	n = 17	
Alter (Jahre)	64.0 [43...79]	67.0 [45...78]	63.0 [43...76]	62.0 [51...79]	62.0 [51...73]	0.96
BMI (kg/m ²)	24.8 [13.6...46.5]	29.4 [19.3...39.7]	23.4 [13.6...46.5]	23.8 [15.8...32.0]	27.4 [22.9...57.1]	0.40
pack years	40.0 [0...100]	41.5 [0...100]	42.0 [18...75]	34.0 [20...60]	25.0 [20...40]	< 0.001
Hämoglobin (mg/l)	14.4 [10.3...16.9]	14.3 [10.3...16.4]	14.7 [10.4...16.9]	13.8 [11.6...16.8]	11.6 [9.6...14.8]	< 0.001
Hämatokrit (%)	42.4 [31.1...49.9]	42.4 [31.1...47.4]	42.8 [31.1...49.9]	42.0 [37.6...49.4]	35.7 [27.8...41.6]	< 0.001
Thrombozyten (10 ⁹ /l)	292 [145...787]	239 [172...417]	322 [154...787]	293 [145...504]	289 [177...569]	0.56
Leukozyten (10 ⁹ /l)	8.6 [6.1...18.3]	8.1 [6.2...11.9]	9.4 [6.1...18.3]	8.7 [6.8...17.8]	8.7 [6.4...11.6]	0.69
FEV₁ (l)	1.13 [0.45...2.34]	1.46 [0.96...2.34]	1.11 [0.76...1.76]	0.69 [0.45...0.91]	2.32 [1.33...4.24]	< 0.001
FEV₁ % Soll (%)	42.6 [16.3...76.2]	58.2 [38.2...76.2]	41.1 [30.0...48.5]	27.4 [16.3...29.7]	76.1 [55.2...145.8]	< 0.001
FEV₁ % VC (%)	46.9 [22.2...67.0]	57.8 [41.7...67.0]	45.3 [30.2...63.8]	34.5 [22.2...49.3]	83.3 [71.0...99.7]	< 0.001
MEF25 (l/s)	0.25 [0.10...0.62]	0.31 [0.13...0.62]	0.25 [0.12...0.38]	0.17 [0.10...0.36]	1.02 [0.36...4.58]	< 0.001
MEF25 % Soll (%)	18.8 [7.3...41.4]	24.7 [10.9...41.4]	17.5 [8.8...32.1]	12.9 [7.3...30.0]	62.3 [29.6...286.0]	< 0.001
RV (l)	4.46 [2.27...8.48]	3.62 [2.72...5.37]	4.76 [2.27...8.48]	6.05 [3.66...8.26]	2.60 [1.12...3.76]	< 0.001
RV % Soll (%)	200.6 [101.9...376.8]	158.5 [114.0...240.1]	203.6 [101.9...376.8]	273.7 [204.5...317.5]	113.9 [48.1...146.8]	< 0.001
TLC (l)	7.09 [4.1...14.09]	6.17 [5.1...8.9]	7.21 [4.1...11.7]	8.46 [5.0...14.1]	5.40 [3.0...8.2]	< 0.01

TLC % Soll (%)	116.8 [71.5...179.2]	111.1 [83.3...149.1]	116.8 [71.5...169.5]	135.8 [107.5...179.2]	84.5 [52.3...111.0]	< 0.001
RV % TLC (%)	64.8 [45.1...86.2]	57.4 [45.1...70.6]	65.2 [52.3...73.6]	73.5 [65.4...86.2]	50.1 [26.5...63.5]	< 0.001
TLCO / VA (mmol/min/kPa/l)	0.69 [0.01...1.72]	0.84 [0.37...1.72]	0.64 [0.13...1.27]	0.37 [0.01...0.90]	1.03 [0.72...1.91]	< 0.001
TLCO / VA % Soll (%)	49.0 [0.95...105.4]	60.3 [25.6...105.4]	42.3 [8.0...89.1]	27.8 [0.95...68.6]	77.6 [57.3...138.5]	< 0.001

Tabelle 3.1 Gesamtübersicht der Studienteilnehmer, die Ergebnisse werden als Mediane dargestellt [Minimum...Maximum]

Abkürzungen: BMI (Body Mass Index), FEV1 (Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde), MEF25 (Mittlerer expiratorischer Fluss nach Ausatmung von 25% der Vitalkapazität), RV (Residualvolumen), TLC (Totale Lungenkapazität), TLCO/VA (Krogh-Faktor)

Der Altersmedian der Patienten lag bei 64 Jahren, die Altersspanne zwischen 43 und 79 Jahren.

Im Vergleich der Kontrollen zu den COPD-Patienten zeigten Alter, BMI, Thrombozyten und Leukozytenzahl keine signifikanten Unterschiede, während alle übrigen erhobenen Parameter (pack years, Hämoglobinwert, Hämatokrit und alle erhobenen Lungenfunktionsparameter) sich hochsignifikant unterschieden. ($p < 0,01 - 0,001$).

Ein signifikanten Unterschied zwischen den COPD GOLD-Gruppen 2, 3 und 4 zeigte lediglich der Body Mass Index für GOLD 2 gegenüber GOLD 3 und GOLD 2 gegenüber GOLD 4 ($p < 0,02$), sowie die Thrombozytenzahlen zwischen COPD GOLD 2 (239×10^9) und COPD GOLD 3 (322×10^9 , $p < 0,05$).

3.2 BDNF-Konzentration im Serum:

In der Gesamtgruppe der COPD-Patienten zeigte sich ein signifikant erhöhter BDNF-Gehalt im Serum, verglichen mit dem BDNF-Gehalt der Kontrollgruppe: 27.5 vs. 22.7 ng/ml, $p < 0.001$ (Abb.3.1). Auch war für jede einzelne COPD GOLD-Gruppen der BDNF-Spiegel im Serum signifikant höher als in der Kontrollgruppe : COPD GOLD II (27.4 ng/ml, $p < 0.01$), COPD GOLD III (28.4 ng/ml, $p < 0.01$) ,COPD GOLD IV (27.5 ng/ml, $p < 0.05$), Kontrollgruppe (22.7 ng/ml). Zwischen den verschiedenen COPD GOLD-Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der BDNF-Konzentration im Serum nachweisen. (Abb. 3.1.)

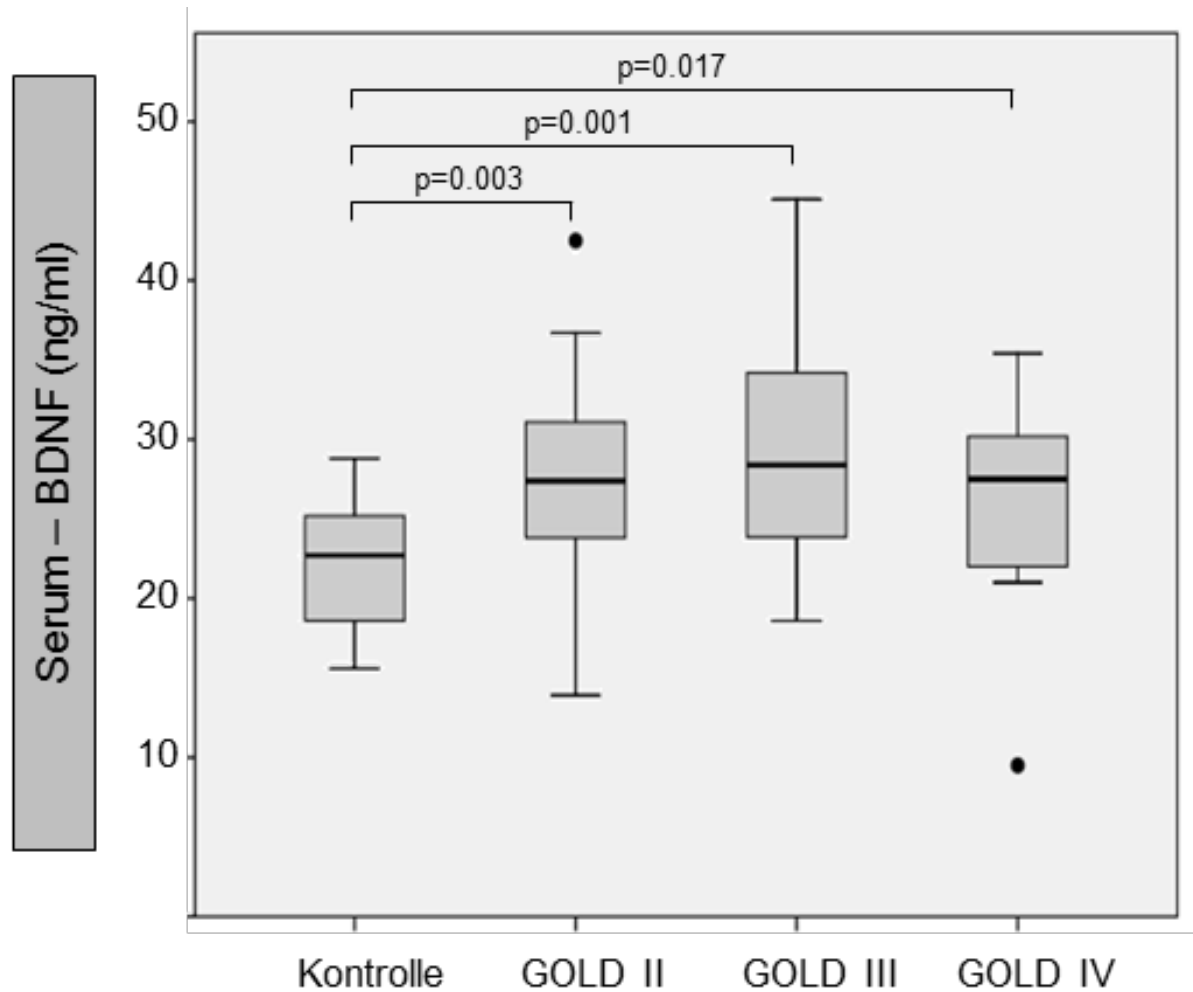


Abbildung 3.1. Gezeigt werden der BDNF-Gehalt im Serum der COPD-Patienten der Stadien GOLD 2-4 sowie der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die Linie innerhalb der Box dem Median entspricht, der Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante entspricht dem Interquartilenabstand. Die vertikale Linie entspricht den Werten, deren Bereich weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt sind. Die schwarzen Punkte entsprechen Ausreißer-Werten, die mehr als den 1,5-fachen Interquartilenabstand von den Boxrändern entfernt sind.

3.3 BDNF-Konzentration in den Thrombozyten:

Die auf Basis der Thrombozytenzahl berechneten BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten wiesen ebenfalls Unterschiede bezüglich signifikant höherer BDNF-Konzentrationen bei der Gruppe der COPD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen: 102.1 vs. 73.3 pg/10⁶ Thrombozyten, $p < 0.01$ (Abb. 3.2). Für die COPD-GOLD 2 und GOLD 3-Patienten ließ sich ein signifikant höherer BDNF-Gehalt der Thrombozyten nachweisen, nicht aber für Patienten mit COPD GOLD 4 im Vergleich zur Kontrollgruppe: 76.7 pg/10⁶ Thrombozyten vs 73.3 pg/10⁶ Thrombozyten, $p = 0.21$. Seitens der Medianwerte zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme der BDNF-Konzentration in Thrombozyten von GOLD-Stadium II zu GOLD-Stadium IV (Abb. 3.2).

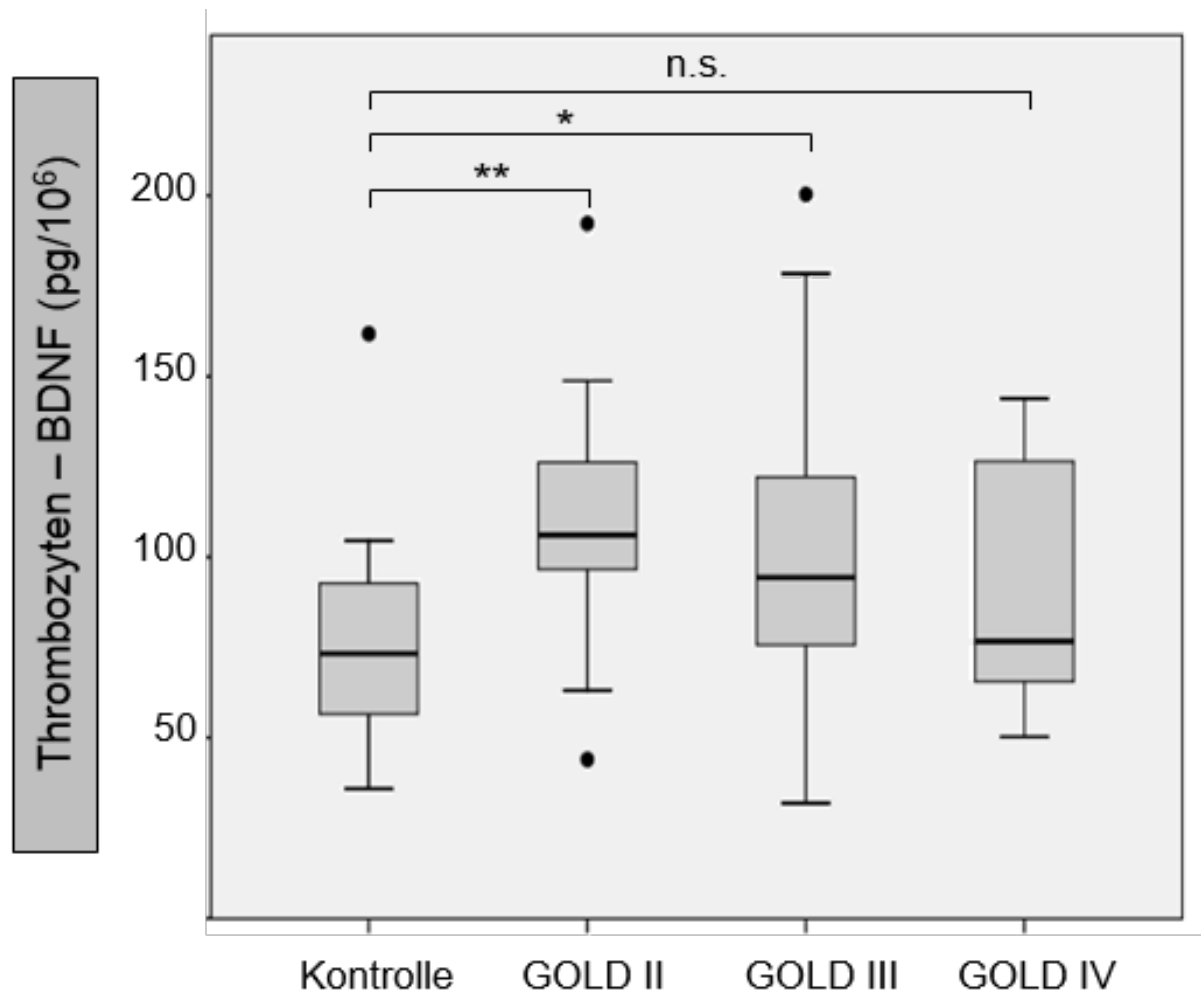


Abb. 3.2. Gezeigt werden die BDNF-Beladung der Thrombozyten bei COPD-Patienten der Stadien GOLD 2-4 sowie der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die Linie innerhalb der Box dem Median entspricht, der Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante entspricht dem Interquartilenabstand. Die vertikale Linie entspricht den Werten, deren Bereich weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt sind. Die schwarzen Punkte entsprechen Ausreißer-Werten, die mehr als den 1,5-fachen Interquartilenabstand von den Boxrändern entfernt sind.

3.4 TGF- β 1-Konzentration im Serum:

Für die TGF- β 1-Konzentrationen im Serum der COPD-Patienten im Stadium GOLD 2 ließ sich eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentrationen (43.3 ng/ml) im Vergleich zu den TGF- β 1-Serumkonzentrationen der Kontrollgruppe nachweisen (33.7 ng/ml, $p < 0.05$) (Abb.3.3.). Bei den COPD-Patienten im Stadium GOLD 3 zeigten sich ebenfalls signifikant höhere TGF- β 1-Konzentrationen im Serum (49.3 ng/ml) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p < 0.01$). Es zeigte sich ferner eine Tendenz zu einem weiteren, statistisch nicht signifikanten Ansteigen der TGF- β 1-Konzentration bei COPD GOLD 4-Patienten mit einem Medianhöchstwert von 53.9 ng/ml.

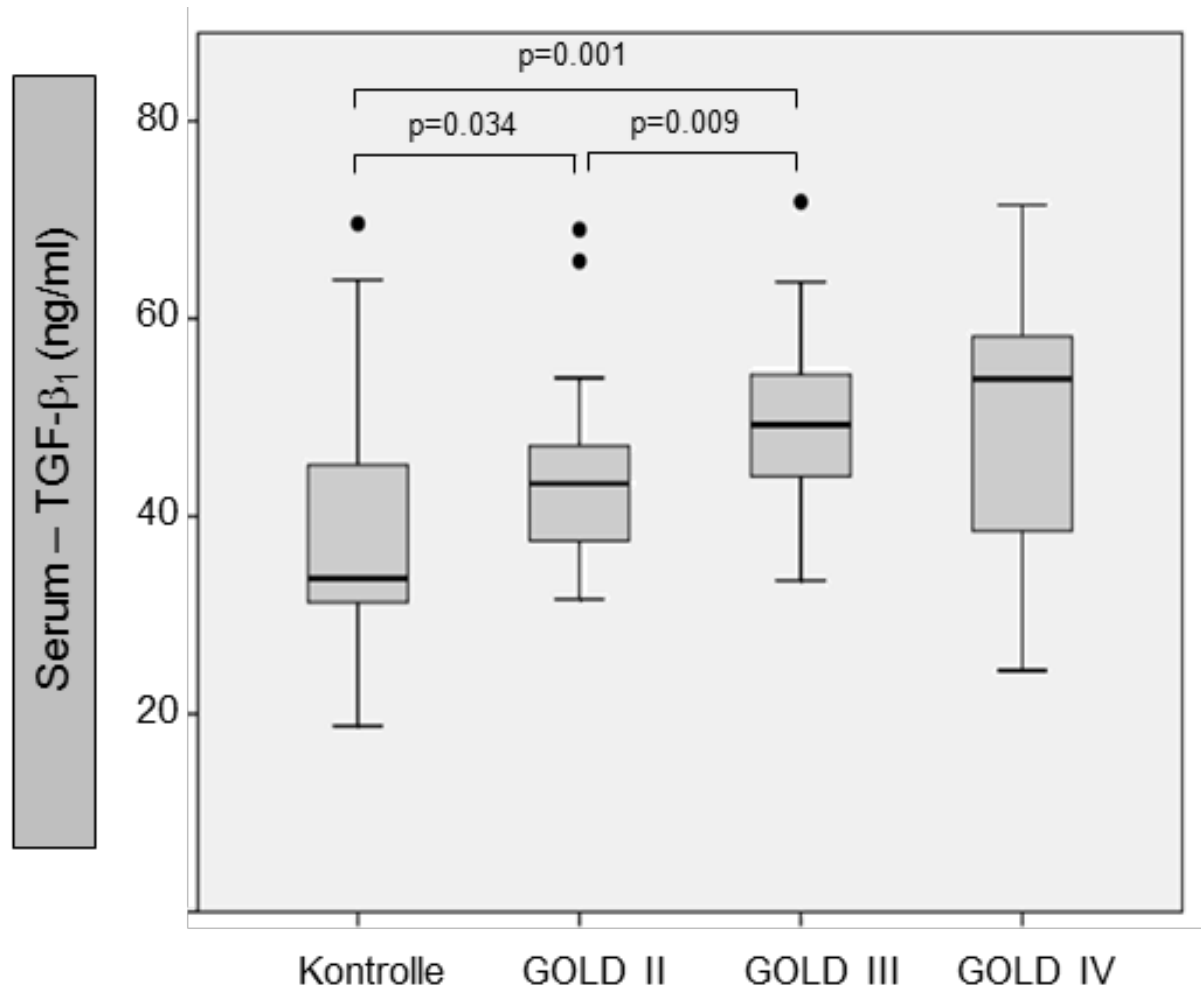


Abb. 3.3. Gezeigt werden die TGF- β_1 -Konzentrationen im Serum der COPD-Patienten der Stadien GOLD 2-4 sowie der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die Linie innerhalb der Box dem Median entspricht, der Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante entspricht dem Interquartilenabstand. Die vertikale Linie entspricht den Werten, deren Bereich weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt sind. Die schwarzen Punkte entsprechen Ausreißer-Werten, die mehr als den 1,5-fachen Interquartilenabstand von den Boxrändern entfernt sind.

3.5 Serotoninkonzentration im Serum

Zudem zeigten sich mit Anstieg der GOLD-Schweregrade 2-4 tendenziell ansteigende Serotonin-Serumkonzentrationen, ausgehend von einem Medianwert von 73,9 ng/ml in der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied war nur für die COPD GOLD 3-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar ($p=0,018$), nicht aber für die COPD GOLD-Gruppe 2, GOLD-Gruppe 4 und für die COPD-Gesamtgruppe (Abbildung 3.4)

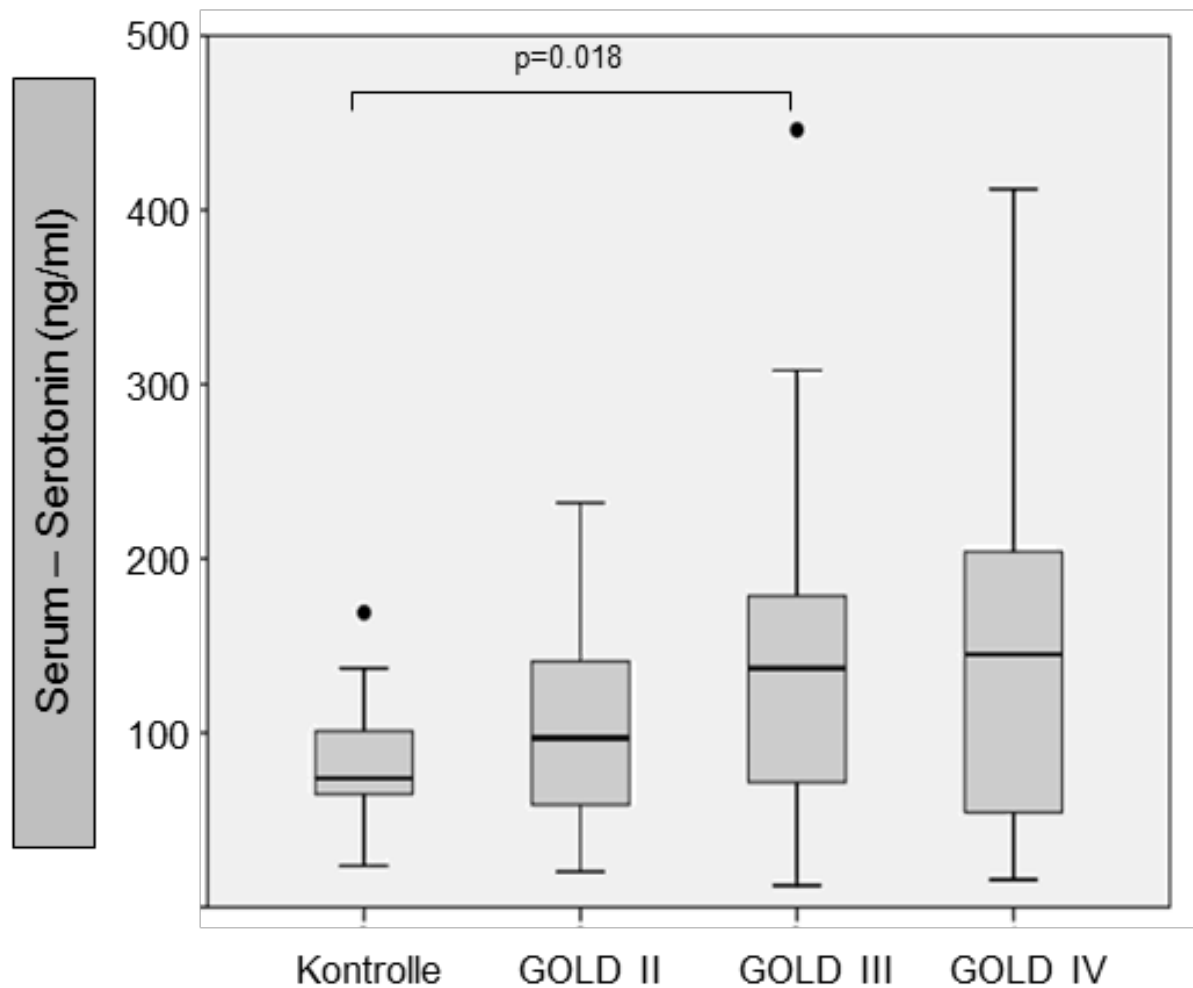


Abb. 3.4. Gezeigt werden die Serotonin-Konzentrationen im Serum bei COPD-Patienten der Stadien GOLD 2-4 sowie der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei die Linie innerhalb der Box dem Median entspricht, der Abstand zwischen oberer und unterer Boxkante entspricht dem Interquartilenabstand. Die vertikale Linie entspricht den Werten, deren Bereich weniger als 1,5 Interquartilenabstände vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt sind. Die schwarzen Punkte entsprechen Ausreißer-Werten, die mehr als den 1,5-fachen Interquartilenabstand von den Boxrändern entfernt sind

3.6 Korrelation der Serumkonzentrationen von BDNF, TGF- β 1 und Serotonin miteinander

Für die Serumkonzentrationen von BDNF und TGF- β 1 fand sich eine Korrelation bei den COPD-Patienten ($r=0.41$, $p<0.01$) und bei der Kontrollgruppe ($r=0.57$, $p<0.05$)(Abb.3.5). Die BDNF-Konzentrationen im Serum korrelierte mit der Serotonin-Konzentration bei den COPD-Patienten ($r=0.43$, $p<0.001$), nicht aber in der Kontrollgruppe($r=0.26$, $p<0.32$). Für Serotonin und TGF- β 1 im Serum fanden sich ebenfalls Korrelationen bei den COPD-Patienten ($r=0.59$, $p<0.001$) wie auch bei der Kontrollgruppe ($r=0.7$, $p<0.01$).

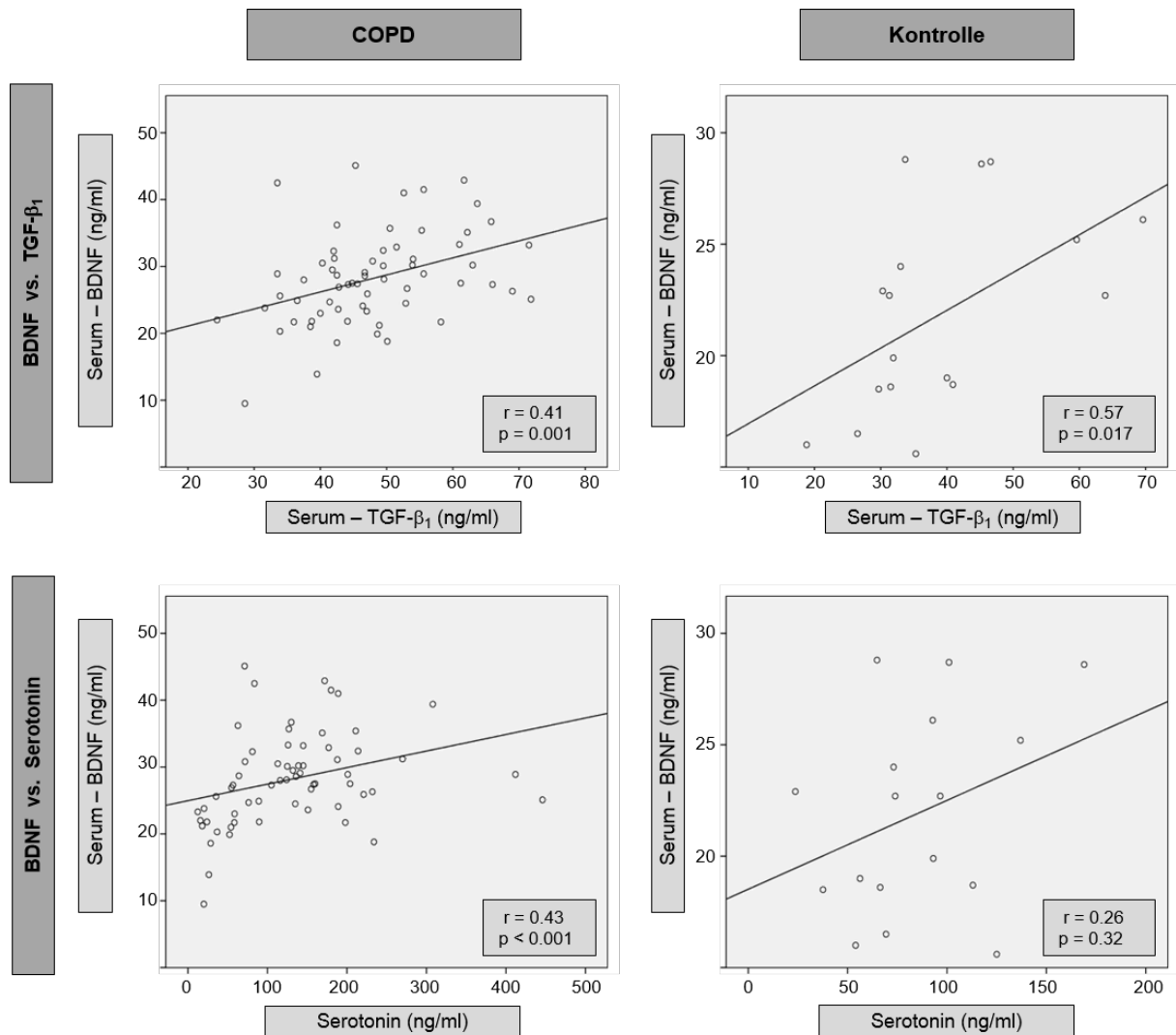


Abb. 3.5. Gezeigt werden die Korrelationen von BDNF-Konzentrationen im Serum mit den Serotonin- und TGF-β₁-Konzentrationen bei COPD- und Kontrollgruppe. Die Linie stellt die anhand von SPSS berechnete Regressionslinie dar. Der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) wie auch die Signifikanz (p) sind jeweils im rechten Unterfeld der Grafiken angegeben.

3.7 Korrelationen von BDNF, TGF- β 1 und Serotonin mit der Lungenfunktion

Bei der COPD-Gesamtgruppe konnte keine Korrelation des FEV1-Wertes mit den Serumspiegeln der Thrombozytenmediatoren BDNF und TGF- β 1 nachgewiesen werden. (Abbildung 3.6). Bei der Analyse der Korrelationen in den COPD-Subgruppen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den Serum-BDNF-Konzentrationen und dem FEV1-Wert nur in der Gruppe der Patienten im spirometrischen Stadium III ($r=-0.41$, $p<0.05$).

Die Thrombozytenmediatoren TGF- β 1 und Serotonin zeigten keine signifikanten Korrelationen mit der Lungenfunktion in den einzelnen Subgruppen. Bei der gemeinsamen Betrachtung der spirometrischen COPD-Stadien II und III zeigte sich eine signifikante Korrelation der FEV1 nur mit TGF- β 1, aber nicht mit BDNF oder Serotonin.

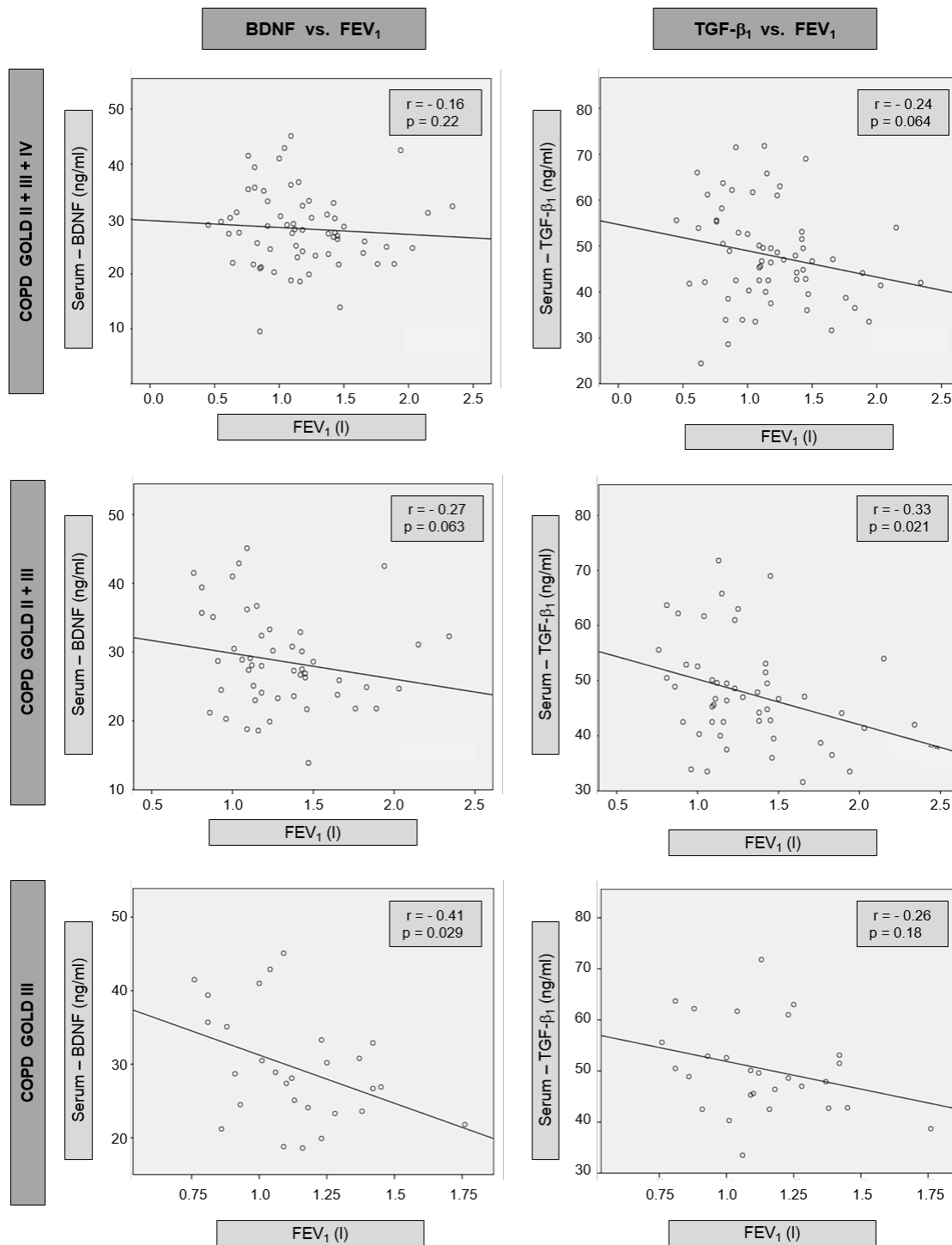


Abb.3.6. Gezeigt werden die Korrelationen von BDNF-Konzentrationen im Serum sowie TGF-β1 im Serum mit den FEV1-Werten bei der gesamten COPD-Gruppe, der COPD GOLD 3-Gruppe und der COPD GOLD 2+3-Untergruppe. Die Linie stellt die anhand von SPSS berechnete Regressionslinie dar. Der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) wie auch die Signifikanz (p) sind jeweils im rechten Oberfeld der Grafiken angegeben.

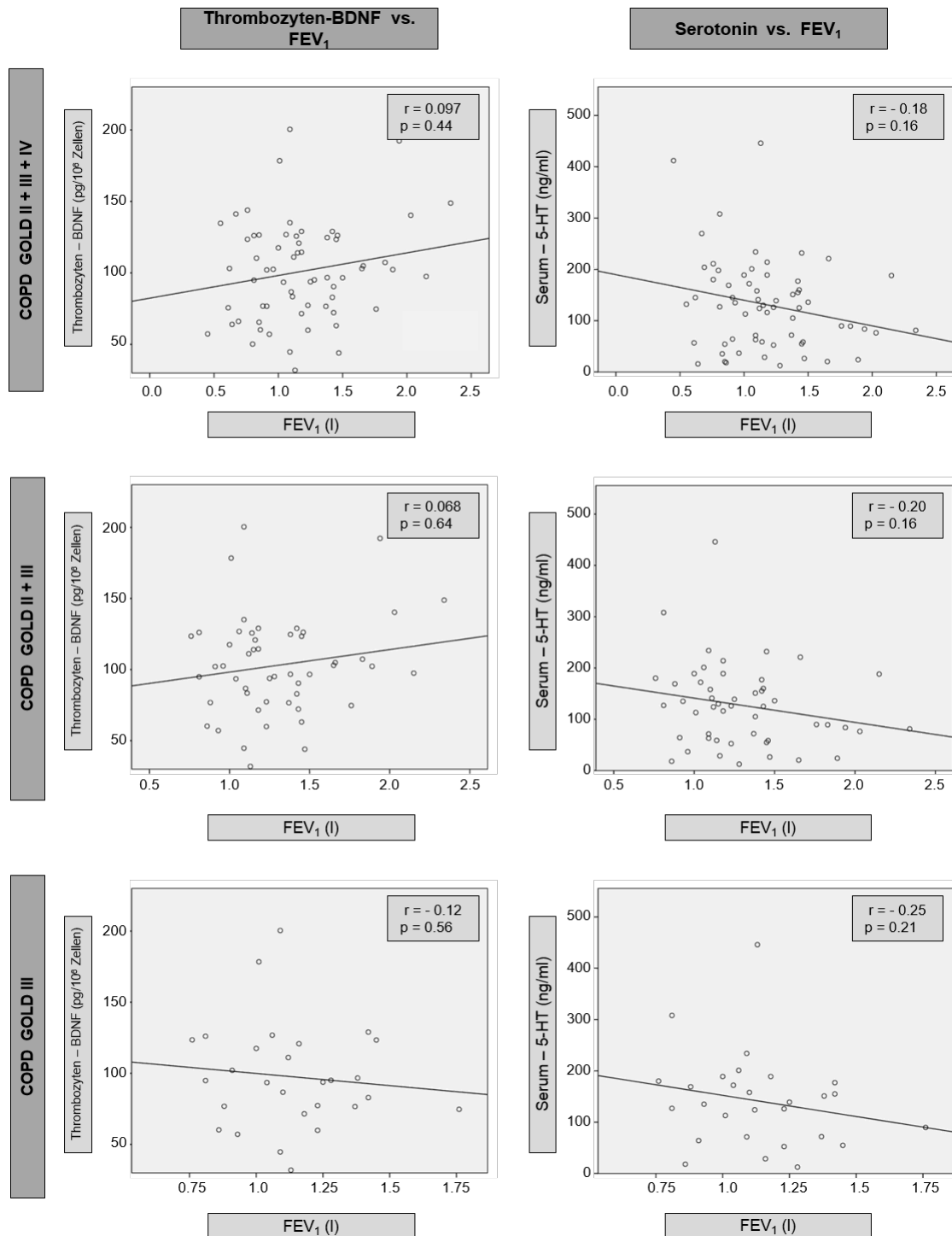


Abb. 3.7. Gezeigt werden die Korrelationen von thrombozytärer BDNF-Beladung sowie Serotonin im Serum mit den FEV₁-Werten bei der gesamten COPD-Gruppe, der COPD GOLD 2+3-Gruppe und der COPD GOLD 3-Gruppe. Die Linie stellt die anhand von SPSS berechnete Regressionslinie dar. Der Spearman-Korrelationskoeffizient (r) wie auch die Signifikanz (p) sind jeweils im rechten Oberfeld der Grafiken angegeben

IV. DISKUSSION

4.1 Neurotrophine bei obstruktiven Atemwegserkrankungen

Es finden sich zunehmend Hinweise darauf, dass die Gruppe der Neurotrophine eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese obstruktiver Atemwegserkrankungen einnimmt[69, 74, 79]. So wurde nachgewiesen, dass bei Patienten, die an allergischem Asthma bronchiale leiden, ein Zusammenhang zwischen den erhöhten systemischen BDNF-Konzentrationen und den Lungenfunktionsparametern besteht. Die systemischen TGF- β 1-Konzentrationen waren hingegen im Normbereich [79, 86]. Die hier vorliegende Dissertationsschrift ist die erste Studie, welche systematisch die BDNF-Serumspiegel bei der COPD untersucht. Es wurde gezeigt, dass - im Gegensatz zu Asthma - die COPD durch eine gleichzeitige Erhöhung der BDNF- und TGF- β 1-Konzentrationen gekennzeichnet ist. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass eine Stadien-abhängige Korrelation zwischen diesen Thrombozytenmediatoren und den spirometrischen GOLD-Stadien bei der COPD existiert.

Für das Neurotrophin BDNF wurde eine Rolle als Schlüsselmediator der neuromuskulären Plastizität beschrieben[78, 79, 87]. Für TGF- β 1 wurde eine wesentliche Funktion in der Pathogenese des Bindegewebs-Remodellings beziehungsweise fibrosierender Prozesse nachgewiesen[84, 85]. BDNF und TGF- β 1 werden in den alpha-Granula der menschlichen Thrombozyten gespeichert, und hieraus durch Degranulation nach Aktivierung freigesetzt[80]. Eine erhöhte thrombozytäre Aktivität wurde sowohl bei COPD[88] als auch bei Asthma bronchiale[89] nachgewiesen; nichtsdestotrotz sind die Vorgänge, die Thrombozyten-Mediatoren bei obstruktiven Atemwegserkrankungen regulieren, immer noch nicht vollständig nachvollzogen. Wie bereits vorher erwähnt, sind die BDNF-Konzentrationen im Serum und in den Thrombozyten bei Asthma erhöht, wohingegen TGF- β 1 unverändert ist. Die BDNF-Konzentrationen korrelierten mit dem Ausmaß der Atemwegsobstruktion sowie der bronchialen Hyperreagibilität[79]. Diese klinischen Daten werden untermauert durch die in Tier-Modellen gewonnenen Erkenntnisse zum allergischen Asthma bronchiale, in denen BDNF eine wichtige Rolle in der Pathogenese der bronchialen Hyperreagibilität und der Atemwegsobstruktion spielt[76, 90].

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen von BDNF bei Patienten mit COPD nachgewiesen. Diese Befunde

passen gut zu den bereits experimentell gewonnenen Erkenntnis in einem COPD-Modell der Ratte, welches ebenfalls eine systemische Überproduktion von BDNF bei COPD zeigte[91]. Eine kürzlich erschienene Studie untersuchte die Serum-Konzentrationen von 92 Serum-Parametern bei COPD-Patienten und identifizierte BDNF als einen der drei am stärksten erhöhten Entzündungsmediatoren. Die weiteren beiden genannten Entzündungs-Mediatoren waren der CD40-Ligand wie auch der Epithelial Growth Factor[68].

Es fand sich eine Korrelation der BDNF-Serumspiegel mit den Thrombozytenmediatoren TGF- β 1 und Serotonin bei den Patienten mit COPD. Diese Erkenntnis bestätigt die Ansicht, dass BDNF im Serum aus den Thrombozyten stammt. Es gilt ferner zu beachten, dass in der vorliegenden Doktorarbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der Thrombozyten in der COPD- und der Kontrollgruppe bestanden. Somit ist wahrscheinlich, dass die in der COPD-Gruppe gefundenen erhöhten BDNF-Konzentrationen nicht auf zahlenmäßige Unterschiede der Thrombozyten im peripheren Blut zurückgeführt werden können. Stattdessen scheint eine gesteigerte BDNF-Konzentration in den Granula der Thrombozyten die wahrscheinlichste Ursache der erhöhten BDNF-Serumkonzentrationen zu sein.

4.2 BDNF und langwirksame Beta-Sympathomimetikas (LABA)

Die überwiegende Mehrheit der Patienten (94%) in der vorliegenden Studie wurde mit lang-wirksamen Beta-Sympathomimetikas (LABAs) behandelt, bei der Kontrollgruppe niemand. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen BDNF-Werte in Fall- und Kontrollgruppe auf eine Therapie mit LABAs zurückgeführt werden können, da eine Therapie mit dem LABA Salmeterol einen Anstieg der Serum-BDNF-Konzentration zur Folge haben kann[86]. So könnte BDNF zu den ungünstigen Effekten einer Monotherapie mit inhalativen β 2-Agonisten in der Behandlung des Asthma bronchiale beitragen[92]. Eine medikamentöse Monotherapie bei Asthma-Patienten mit dem langwirksamen β 2-Sympathomimetikum Salmeterol führte zu signifikant erhöhten systemischen BDNF-Konzentrationen. Die erhöhten BDNF-Konzentrationen korrelierten mit der Verschlechterung der bronchialen Hyperreagibilität unter Salmeterol-Monotherapie[86]. Die erhöhten BDNF-Konzentrationen sowie die Verschlechterung der bronchialen Hyperreagibilität wurde durch eine gleichzeitige Therapie mit Fluticason reduziert[86]. Dies bestätigt auch frühere Unter-

suchungen, welche eine Unterdrückung der BDNF-Produktion durch Kortikosteroide nachweisen konnten[79, 93].

Trotzdem gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die Therapie mit LABAs nicht allein für die erhöhten Serum-BDNF-Werte bei den COPD-Patienten verantwortlich ist. Ein erster Beleg hierfür sind die im Rahmen eines COPD-Tiermodells experimentell gewonnene Ergebnisse, wo auch ohne Vorhandensein einer LABA-Therapie erhöhte systemische BDNF-Konzentrationen gemessen wurden[91]. Zusätzlich ist festzustellen, dass bei den COPD-Patienten weder bei zu inhalierenden wie auch oral einzunehmenden Kortikosteroiden ein Einfluss auf die Konzentration der Serum-BDNF-Konzentrationen nachweisbar war. Dies verhält sich somit gegensätzlich zu den Befunden bei Asthma bronchiale[86], sodass ein unterschiedliches BDNF-Reaktionsverhalten auf die medikamentöse Behandlung zwischen COPD- und Asthma-Patienten zu vermuten ist. Schließlich stellt die medikamentöse LABA-Monotherapie eine sichere therapeutische Option in der Behandlung von COPD-Patienten dar, wohingegen die LABA-Monotherapie bei Asthma-Patienten nachteilig sein kann[86]. Somit haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhten BDNF-Konzentrationen bei den COPD-Patienten nicht auf die medikamentöse Therapie zurückzuführen sind, sondern ein Charakteristikum der COPD darstellen.

4.3 Andere medikamentöse Interaktionen

Es gibt Hinweise aus Tiermodellen, die darauf hindeuten, dass auch Medikamente wie Anti-Depressiva[94] und Phosphodiesterase-4-Hemmer[95, 96] einen Anstieg der BDNF-Produktion verursachen können. Im Gegensatz hierzu wurde für Kortikosteroide eine Abnahme der BDNF-Produktion postuliert[79, 93]. Während in der Kontrollgruppe kein Patient mit Kortikosteroiden, Anti-Depressiva oder dem PDE4-Hemmer Roflumilast behandelt wurde, fand sich in der COPD-Gruppe ein geringer Anteil der Patienten unter medikamentöser Therapie mit Anti-Depressiva (8%), oralen Kortikosteroiden (21%) sowie Roflumilast (8%). Obwohl sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den BDNF-Konzentrationen der mit Kortikosteroiden, Roflumilast sowie Anti-Depressiva medikamentös therapierten COPD-Patienten und der Kontrollgruppe fanden, lässt sich feststellen, dass im Hinblick auf die möglichen Einflüsse unterschiedlicher Klassen von Anti-Depressiva, Roflumilast oder oralen Kortikosteroiden die vorliegende Studie nicht genügend aussagekräftig ist. Weitere Studien mit einem COPD-Patientengut, welches einen höheren Anteil derart therapierter (Anti-

Depressiva, orale Kortikosteroide, Roflumilast) Patienten enthält, müssen dieser Fragestellung nachgehen.

4.4 Korrelation von BDNF-Konzentration mit dem Schweregrad der COPD

Interessanterweise werden die höchsten BDNF-Konzentrationen bei den COPD-Patienten nicht bei den Patienten mit dem schwersten Erkrankungsgrad gemessen; die höchsten BDNF-Konzentrationen zeigten Patienten im spirometrischen Stadium GOLD 3. Zu beachten ist auch, dass in dieser Untergruppe von COPD-Patienten eine signifikante, negative Korrelation zwischen den FEV1-Werten und den Serum-BDNF-Konzentrationen vorhanden war. Eine vergleichbare Korrelation zeigte sich bei Asthma bronchiale[79]. Die fehlende Korrelation zwischen Serum-BDNF-Konzentrationen und FEV1-Wert in der Gruppe mit dem höchsten Schweregrad (GOLD 4) könnte 3 verschiedene Ursachen haben:

(1)Es ist wahrscheinlich, dass die FEV1 durch die Überblähung erheblich beeinflusst ist. Zuerst gilt es zu betonen, dass die eingeschränkten FEV1-Werte bei COPD durch zweierlei pathophysiologische Veränderungen bedingt sind. Diese Veränderungen sind einerseits die Atemwegobstruktion und Atemflusseinschränkung, andererseits auch die emphysematösen Veränderungen. So zeigten sich in der untersuchten COPD-Population ab GOLD Stadium 4 Residualvolumina, welche größer als 200% der Sollwerte waren. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein schweres Emphysem einen bedeutsamen Einflussfaktor auf die bei der GOLD 4-Untergruppe ermittelten reduzierten FEV1-Werte darstellt. Im Unterschied hierzu fanden sich bei der Patienten-Untergruppe im spirometrischen Stadium 3 signifikant niedrigere Residualvolumina, sodass daraus ableitbar wäre, dass dessen relativer Anteil an den reduzierten FEV1-Werten in der GOLD 3-Untergruppe geringer ist als in der GOLD 4-Untergruppe. Somit ist wahrscheinlich, dass die nicht nachweisbare Korrelation von BDNF-Konzentration im Serum und den FEV1-Werten im Stadium GOLD 4 sich aus der Dominanz des Emphysems bei den Patienten dieser Untergruppe begründet. Somit ist die FEV1 in diesem Stadium ein wenig geeigneter Parameter zur spezifischen Beurteilung der Obstruktion.

(2)Die maximale Produktion von BDNF und damit auch die durch BDNF ausgelösten Effekte könnten bei Patienten im spirometrischen GOLD-Stadium 3 stattfinden. Es

wurde bereits gezeigt, dass wichtige Quellen von BDNF inflammatorische Zellen wie Lymphozyten und Monozyten sind[79]. Die Anzahl der Lymphfollikel, welche wichtige Marker der Entzündung kleiner Atemwege bei COPD darstellen ist in den Wänden der Atemwege bei Patienten im spirometrischen Stadium GOLD 3 am höchsten[36]. Somit ist es denkbar, dass BDNF in diesem COPD-Stadium am stärksten in den Atemwegen von den Immunzellen produziert wird.

Durch das schwergradige Emphysem könnte das Ausmaß der Atemwegsentzündung trotz niedriger FEV1 im Stadium 4 geringer sein[97].

(3)Bei Patienten mit Depression kommt es zu erniedrigten BDNF-Serumspiegeln[98]. Daher könnten die gemessenen BDNF-Konzentrationen im Serum durch begleitende depressive Erkrankungen beeinflusst und/oder verfälscht sein.

Schließlich könnten auch die bei Patienten mit schwersten COPD-Stadien häufigen Depressionen[99] eine Ursache für die Reduktion der Serum-BDNF-Konzentration bei schwerster COPD sein. Depressionen senken die Serum-BDNF-Konzentration bei Menschen[94]. Folglich wäre es denkbar, dass eine die COPD begleitende Depression eine entzündungsbedingte Erhöhung der BDNF-Serumspiegel bei Patienten mit schwerer COPD maskieren kann. Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde aber nicht bezüglich der Eruierung einer möglichen Assoziation von verschiedenen BDNF-Konzentrationen mit möglichen Komorbiditäten z.B. depressiven Begleiterkrankungen bei den verschiedenen COPD-Stadien konzipiert. Diesbezüglich sind daher weitere Studien notwendig.

4.5 Die Rolle und Regulation von TGF- β 1 bei der COPD

Im Gegensatz zu den Befunden bei Patienten mit Asthma bronchiale[79] zeigte sich bei COPD-Patienten ein Anstieg der TGF- β 1-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dieser Befund passt zu einer Studie, in der die TGF- β 1-Konzentrationen auch im Plasma von COPD-Patienten erhöht waren[100]. Darüber hinaus fand sich bei den COPD-Patienten eine Korrelation von BDNF mit TGF- β 1, ein Umstand, der bei Asthma nicht nachzuweisen war[79]. Folglich erscheint es, dass eine COPD durch einen Anstieg beider Thrombozyten-Mediatoren BDNF und TGF- β 1 charakterisiert ist. Bemerkenswerterweise fanden sich aber die höchsten Medianwerte der BDNF-Konzentrationen bei Patienten im Stadium GOLD 3, die höchsten

Medianwerte der TGF- β 1-Konzentrationen hingegen bei Patienten im spirometrischen GOLD-Stadium 4.

TGF- β 1 zeichnet sich durch eine Vielzahl von Einflüssen auf den Organismus aus. Hierfür zu nennen sind beispielsweise ein immunsuppressiver Effekt. So wird die Interleukin-2-Produktion und die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen gehemmt[84]. Eine weitere Wirkung von TGF- β 1 ist die Regulation der extrazellulären Ablagerung von Kollagen[101]. Bei COPD-Patienten zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von TGF- β 1 in den Atemwegen, vergesellschaftet mit einem verstärkten fibrotischen Remodeling der Atemwege[102]. Zusätzlich gibt es Erkenntnisse darüber, dass bei COPD-Patienten die erhöhten TGF- β 1-Spiegel überwiegend Gefäß-assoziiert in der retikulären Basalmembran der Bronchien zu finden sind[103]. Für die Pathogenese der COPD und des Emphysems sind nicht nur die erhöhte Bildung von TGF- β 1 verantwortlich; auch verschiedene Polymorphismen und eine erhöhte Signalaktivität von TGF- β 1 werden als Mitspieler bei den pathogenetischen Prozessen angesehen[104, 105].

In der vorliegenden Studie ließen sich mit zunehmendem Schweregrad der COPD steigende Median-TGF- β 1-Serumkonzentrationen nachweisen. Dies unterstützt die Annahme, dass TGF- β 1 eine Rolle in den Vorgängen des Atemwegs-Remodelings bei COPD einnimmt. Es ließ sich jedoch keine signifikante Vergesellschaftung von den Serum-Konzentrationen des TGF- β 1 mit Emphysemmarkern wie dem Residualvolumen oder der CO-Diffusionskapazität nachweisen. Dies spricht für eine komplexere Rolle des TGF- β 1 in der Pathogenese der COPD.

4.6 Serotonin und COPD

Ferner ließ sich eine Tendenz zu erhöhten Serum-Konzentrationen von Serotonin (5-HT) bei den COPD-Patienten feststellen, verglichen mit der Kontrollgruppe. Für die Patienten-Untergruppe im spirometrischen GOLD-Stadium 3 waren die erhöhten Konzentrationen sogar statistisch signifikant. Bezüglich der Serotonin-Konzentrationen im Plasma, welche ausschließlich das zirkulierende Serotonin und nicht das nach Serum-Präparation aus den Thrombozyten freigesetzte Serotonin widerspiegelt, konnte eine Studie erhöhte Serotonin-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit stabiler COPD nachweisen[106]. In der oben genannte Studie mit Serotonin-Plasmakonzentrationen wie auch in der hier vorliegenden Arbeit mit gemessenen Serotonin-Serumkonzentrationen konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen

den Serotonin-Konzentrationen und Lungenfunktionsparametern nachgewiesen werden. Somit ist die Bedeutung erhöhter Serum-Konzentrationen von Serotonin noch völlig unklar.

4.7 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von COPD und Asthma

Es besteht seit langer Zeit eine lebhafte Diskussion über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Asthma und COPD[107].

So besagt die sogenannte „Dutch hypothesis“, dass beide Erkrankungen gemeinsame genetische Faktoren sowie Risikofaktoren zeigen[108]. Diese Vermutung stellt die COPD und das Asthma als Teil des gleichen klinischen und pathophysiologischen Spektrums dar. Je nach Stärke genetischer sowie umweltbedingter Risikofaktoren werden die Phänotypen obstruktiver Lungenerkrankungen entweder in Richtung Asthma oder in Richtung COPD geprägt[109, 110].

Aktuelle klinische Daten scheinen die „Dutch hypothesis“ zu bestätigen. Die lange Zeit als Abgrenzungskriterium zur COPD beschriebene Reversibilität der Atemwegsobstruktion nach Inhalation eines Bronchodilatators[111] ist nicht mehr als eindeutiges Abgrenzungskriterium zur COPD geeignet, da auch COPD-Patienten eine partielle Reversibilität auf Bronchodilatoren zeigen können[112-114]. Zudem wurde in einer Follow-Up-Studie auch bei Asthma-Patienten teilweise eine Entwicklung zu einer irreversiblen Atemwegsobstruktion nachgewiesen, neben der COPD-typischen Reduktion des Transferkoeffizienten[115]. Auch wenn die Obstruktion der „small airways“ als typisch für die COPD gilt, existieren jedoch auch Hinweise auf diese Pathologie bei Asthmatikern[116], wenngleich hier geringere Schweregrade der Obstruktion vorliegen[117].

Im Gegensatz dazu postuliert die sogenannte „British hypothesis“ einen grundsätzlichen Unterschied zwischen beiden Erkrankungen. Die Argumente beziehen sich auf wesentliche Unterschiede in den pathologischen Veränderungen, klinischer Symptomatik sowie der Reaktion auf medikamentöse Therapie[118]. Neueren Genomanalysen zufolge liegt kein gemeinsamer genetischer Hintergrund vor[119].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass sowohl Unterschiede wie auch Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Krankheiten bestehen. Einerseits zeigen sowohl COPD wie auch Asthma eine systemische Hochregulierung von BDNF, welches ein Marker neuromuskulärer Dysfunktionen der Atemwege ist. Ande-

rerseits zeigt nur die COPD eine systemische Hochregulierung von TGF- β 1, welches zum Remodelling der Atemwege und extrazellulären Kollagenablagerung führt.

4.8 Schlussfolgerung

Die vorliegende Dissertationsarbeit zeigt erstmalig, dass die COPD im Gegensatz zu früher berichteten Befunden bei Asthma bronchiale, sowohl durch erhöhte Konzentrationen von BDNF als auch von TGF- β 1 im Serum charakterisiert ist, während Asthma nur erhöhtes BDNF im Serum aufweist. Der Stadien-abhängige Zusammenhang mit den Lungenfunktionsparametern unterstützt die Hypothese, dass diese beiden Thrombozyten-Mediatoren eine Rolle in der Pathogenese der COPD spielen.

V. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kessler, R., et al., *Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study*. Eur Respir J, 2011. **37**(2): p. 264-72.
2. Espinosa de los Monteros, M.J., et al., *Variability of respiratory symptoms in severe COPD*. Arch Bronconeumol, 2012. **48**(1): p. 3-7.
3. Quanjer, P.H., et al., *Implications of adopting the Global Lungs Initiative 2012 all-age reference equations for spirometry*. Eur Respir J, 2013. **42**(4): p. 1046-54.
4. Jones, P.W., *Health status and the spiral of decline*. Copd, 2009. **6**(1): p. 59-63.
5. Bestall, J.C., et al., *Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 1999. **54**(7): p. 581-6.
6. Jones, P.W., et al., *Development and first validation of the COPD Assessment Test*. Eur Respir J, 2009. **34**(3): p. 648-54.
7. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
8. Buist, A.S., et al., *International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 741-50.
9. Mannino, D.M. and A.S. Buist, *Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 765-73.
10. Lokke, A., et al., *Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population*. Thorax, 2006. **61**(11): p. 935-9.
11. Petersen, H., et al., *Rapid lung function decline in smokers is a risk factor for COPD and is attenuated by angiotensin-converting enzyme inhibitor use*. Chest, 2014. **145**(4): p. 695-703.
12. Tan, W.C., et al., *Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study*. Cmaj, 2009. **180**(8): p. 814-20.
13. Hagstad, S., et al., *Passive smoking exposure is associated with increased risk of COPD in never smokers*. Chest, 2014. **145**(6): p. 1298-304.

14. Smith, K.R., *National burden of disease in India from indoor air pollution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13286-93.
15. Ezzati, M., et al., *Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors*. Lancet, 2003. **362**(9380): p. 271-80.
16. Blanc, P.D., et al., *Occupational exposures and COPD: an ecological analysis of international data*. Eur Respir J, 2009. **33**(2): p. 298-304.
17. Stoller, J.K. and L.S. Aboussouan, *Alpha1-antitrypsin deficiency*. Lancet, 2005. **365**(9478): p. 2225-36.
18. Lamprecht, B., et al., *COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study*. Chest, 2011. **139**(4): p. 752-63.
19. Svanes, C., et al., *Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 2010. **65**(1): p. 14-20.
20. Duijts, L., et al., *Fetal exposure to maternal and paternal smoking and the risks of wheezing in preschool children: the Generation R Study*. Chest, 2012. **141**(4): p. 876-85.
21. Silva, G.E., et al., *Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study*. Chest, 2004. **126**(1): p. 59-65.
22. Lange, P., et al., *Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 111-22.
23. Brusselle, G.G., G.F. Joos, and K.R. Bracke, *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2011. **378**(9795): p. 1015-26.
24. Hogg, J.C. and W. Timens, *The pathology of chronic obstructive pulmonary disease*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 435-59.
25. Sinden, N.J. and R.A. Stockley, *Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence*. Thorax, 2010. **65**(10): p. 930-6.
26. Hulbert, W.C., et al., *Airway permeability to horseradish peroxidase in guinea pigs: the repair phase after injury by cigarette smoke*. Am Rev Respir Dis, 1981. **123**(3): p. 320-6.
27. Fels, A.O. and Z.A. Cohn, *The alveolar macrophage*. J Appl Physiol (1985), 1986. **60**(2): p. 353-69.

28. Lindert, J., et al., *Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(6): p. 688-96.
 29. Ferhani, N., et al., *Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(9): p. 917-27.
 30. Freeman, C.M., et al., *Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(12): p. 1179-88.
 31. Saetta, M., et al., *CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 822-6.
 32. Cosio, M.G., M. Saetta, and A. Agusti, *Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2009. **360**(23): p. 2445-54.
 33. Urbanowicz, R.A., et al., *Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients*. Respir Res, 2010. **11**: p. 76.
 34. Di Stefano, A., et al., *T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**(2): p. 316-24.
 35. Grumelli, S., et al., *An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema*. PLoS Med, 2004. **1**(1): p. e8.
 36. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2645-53.
 37. van der Strate, B.W., et al., *Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell?* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(7): p. 751-8.
 38. Lee, S.H., et al., *Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 567-9.
 39. Greene, C.M., et al., *Anti-proline-glycine-proline or antielastin autoantibodies are not evident in chronic inflammatory lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(1): p. 31-5.
 40. Polverino, F., et al., *B Cell-Activating Factor. An Orchestrator of Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(6): p. 695-705.
-

41. Seys, L.J., et al., *Role of B Cell-Activating Factor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(6): p. 706-18.
42. Hogg, J.C., P.T. Macklem, and W.M. Thurlbeck, *Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease*. N Engl J Med, 1968. **278**(25): p. 1355-60.
43. Cosio, M.G., K.A. Hale, and D.E. Niewoehner, *Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways*. Am Rev Respir Dis, 1980. **122**(2): p. 265-21.
44. Hale, K.A., et al., *Lung disease in long-term cigarette smokers with and without chronic air-flow obstruction*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(5): p. 716-21.
45. Matsuba, K. and W.M. Thurlbeck, *The number and dimensions of small airways in emphysematous lungs*. Am J Pathol, 1972. **67**(2): p. 265-75.
46. Stockley, R.A., *Neutrophils and protease/antiprotease imbalance*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 2): p. S49-52.
47. Sommerhoff, C.P., et al., *Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 682-9.
48. Cavarra, E., et al., *Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(2): p. L412-7.
49. Shapiro, S.D., *Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): p. 98-102.
50. Mead, J., et al., *Significance of the relationship between lung recoil and maximum expiratory flow*. J Appl Physiol, 1967. **22**(1): p. 95-108.
51. Holguin, F., et al., *Comorbidity and mortality in COPD-related hospitalizations in the United States, 1979 to 2001*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2005-11.
52. Sin, D.D., L. Wu, and S.F. Man, *The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature*. Chest, 2005. **127**(6): p. 1952-9.
53. Mannino, D.M., et al., *Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD*. Eur Respir J, 2008. **32**(4): p. 962-9.

54. Jorgensen, N.R., et al., *The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a cross sectional study*. Respir Med, 2007. **101**(1): p. 177-85.
55. Gosker, H.R., et al., *Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2003. **22**(2): p. 280-5.
56. Montes de Oca, M., et al., *Peripheral muscle composition and health status in patients with COPD*. Respir Med, 2006. **100**(10): p. 1800-6.
57. Shorr, A.F., et al., *Anemia in chronic obstructive pulmonary disease: epidemiology and economic implications*. Curr Med Res Opin, 2008. **24**(4): p. 1123-30.
58. John, M., et al., *Prevalence of anemia in chronic obstructive pulmonary disease: comparison to other chronic diseases*. Int J Cardiol, 2006. **111**(3): p. 365-70.
59. Cote, C., et al., *Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD*. Eur Respir J, 2007. **29**(5): p. 923-9.
60. Yohannes, A.M., R.C. Baldwin, and M.J. Connolly, *Depression and anxiety in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Age Ageing, 2006. **35**(5): p. 457-9.
61. Hill, K., et al., *Anxiety and depression in end-stage COPD*. Eur Respir J, 2008. **31**(3): p. 667-77.
62. Fabbri, L.M. and K.F. Rabe, *From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome?* Lancet, 2007. **370**(9589): p. 797-9.
63. Sevenoaks, M.J. and R.A. Stockley, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype?* Respir Res, 2006. **7**: p. 70.
64. Agusti, A.G., et al., *Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2003. **21**(2): p. 347-60.
65. Gan, W.Q., et al., *Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis*. Thorax, 2004. **59**(7): p. 574-80.
66. Vestbo, J., et al., *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE)*. Eur Respir J, 2008. **31**(4): p. 869-73.

67. Agusti, A., et al., *Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37483.
68. Loza, M.J., et al., *Systemic inflammatory profile and response to anti-tumor necrosis factor therapy in chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res, 2012. **13**: p. 12.
69. Pinto-Plata, V., et al., *Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters*. Thorax, 2007. **62**(7): p. 595-601.
70. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, *Physiology of the neurotrophins*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 289-317.
71. Nockher, W.A. and H. Renz, *Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(3): p. 583-9.
72. Ricci, A., et al., *Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(1): p. 12-9.
73. Ricci, A., et al., *Increased pulmonary neurotrophin protein expression in idiopathic interstitial pneumonias*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2007. **24**(1): p. 13-23.
74. Lommatzsch, M., A. Braun, and H. Renz, *Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **992**: p. 241-9.
75. Lommatzsch, M., et al., *Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1183-93.
76. Braun, A., et al., *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation*. Br J Pharmacol, 2004. **141**(3): p. 431-40.
77. Tortorolo, L., et al., *Neurotrophin overexpression in lower airways of infants with respiratory syncytial virus infection*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(2): p. 233-7.
78. Lommatzsch, M., et al., *Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult*. Respir Med, 2007. **101**(7): p. 1493-9.

79. Lommatzsch, M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(2): p. 115-20.
 80. Fujimura, H., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation*. Thromb Haemost, 2002. **87**(4): p. 728-34.
 81. Lommatzsch, M., et al., *The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(1): p. 115-23.
 82. Kornerup, K.N. and C.P. Page, *The role of platelets in the pathophysiology of asthma*. Platelets, 2007. **18**(5): p. 319-28.
 83. Pircher, R., P. Jullien, and D.A. Lawrence, *Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(1): p. 30-7.
 84. Kim, I.Y., M.M. Kim, and S.J. Kim, *Transforming growth factor-beta : biology and clinical relevance*. J Biochem Mol Biol, 2005. **38**(1): p. 1-8.
 85. Araya, J. and S.L. Nishimura, *Fibrogenic reactions in lung disease*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 77-98.
 86. Lommatzsch, M., et al., *Adverse effects of salmeterol in asthma: a neuronal perspective*. Thorax, 2009. **64**(9): p. 763-9.
 87. Aravamudan, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation of human airway smooth muscle cells*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(4): p. 812-23.
 88. Maclay, J.D., et al., *Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD*. Thorax, 2011. **66**(9): p. 769-74.
 89. Johansson, M.W., et al., *Platelet activation, P-selectin, and eosinophil beta1-integrin activation in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(5): p. 498-507.
 90. Braun, A., et al., *Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(4): p. 537-46.
 91. Wang, Q., et al., *[Changes of BDNF expression in hippocampus and serum of rats with artificial chronic obstructive pulmonary disease]*. Sheng Li Xue Bao, 2011. **63**(6): p. 505-10.
 92. Johnston, S.L. and M.R. Edwards, *Mechanisms of adverse effects of {beta}-agonists in asthma*. Thorax, 2009. **64**(9): p. 739-41.
-

93. Lommatzsch, M., J. Klotz, and J.C. Virchow, Jr., *Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2715-8; author reply 2715-8.
 94. Autry, A.E. and L.M. Monteggia, *Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(2): p. 238-58.
 95. Itoh, T., M. Tokumura, and K. Abe, *Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats*. Eur J Pharmacol, 2004. **498**(1-3): p. 135-42.
 96. DeMarch, Z., et al., *Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease*. Neurobiol Dis, 2008. **30**(3): p. 375-87.
 97. Hogg, J.C., et al., *What drives the peripheral lung-remodeling process in chronic obstructive pulmonary disease?* Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(8): p. 668-72.
 98. Neto, F.L., et al., *Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence*. Curr Neuropharmacol, 2011. **9**(4): p. 530-52.
 99. Yohannes, A.M., et al., *Depression and anxiety in chronic heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, relevance, clinical implications and management principles*. Int J Geriatr Psychiatry, 2010. **25**(12): p. 1209-21.
 100. Mak, J.C., et al., *Elevated plasma TGF-beta1 levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Med, 2009. **103**(7): p. 1083-9.
 101. Kenyon, N.J., et al., *TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice*. Thorax, 2003. **58**(9): p. 772-7.
 102. Takizawa, H., et al., *Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(6): p. 1476-83.
 103. Soltani, A., et al., *Vessel-associated transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is increased in the bronchial reticular basement membrane in COPD and normal smokers*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39736.
 104. Hersh, C.P., D.L. DeMeo, and E.K. Silverman, *National Emphysema Treatment Trial state of the art: genetics of emphysema*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(4): p. 486-93.
-

105. Ito, M., et al., *The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema phenotype of COPD in Japanese*. Intern Med, 2008. **47**(15): p. 1387-94.
106. Lau, W.K., et al., *The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31617.
107. Brusselle, G.G., *Matrix metalloproteinase 12, asthma, and COPD*. N Engl J Med, 2009. **361**(27): p. 2664-5.
108. Postma, D.S. and H.M. Boezen, *Rationale for the Dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD*. Chest, 2004. **126**(2 Suppl): p. 96S-104S; discussion 159S-161S.
109. Tam, A. and D.D. Sin, *Pathobiologic mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease*. Med Clin North Am, 2012. **96**(4): p. 681-98.
110. Postma, D.S., et al., *Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments?* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(12): p. 1588-94.
111. Lynes, D. and K. Frankland, *Reversibility testing in patients with asthma and COPD*. Nurs Stand, 2008. **23**(3): p. 45-9.
112. Tashkin, D.P., et al., *Bronchodilator responsiveness in patients with COPD*. Eur Respir J, 2008. **31**(4): p. 742-50.
113. Celli, B.R., et al., *Bronchodilator responsiveness and onset of effect with budesonide/formoterol pMDI in COPD*. Respir Med, 2011. **105**(8): p. 1176-88.
114. Tashkin, D.P., et al., *A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1543-54.
115. Vonk, J.M., et al., *Risk factors associated with the presence of irreversible airflow limitation and reduced transfer coefficient in patients with asthma after 26 years of follow up*. Thorax, 2003. **58**(4): p. 322-7.
116. van den Berge, M., et al., *Small airway disease in asthma and COPD: clinical implications*. Chest, 2011. **139**(2): p. 412-23.
117. Paredi, P., et al., *Comparison of inspiratory and expiratory resistance and reactance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 2010. **65**(3): p. 263-7.

118. Barnes, P.J., *Against the Dutch hypothesis: asthma and chronic obstructive pulmonary disease are distinct diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(3): p. 240-3; discussion 243-4.
119. Smolonska, J., et al., *Common genes underlying asthma and COPD? Genome-wide analysis on the Dutch hypothesis*. Eur Respir J, 2014.

VII. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Alte Schweregradeinteilung der COPD anhand der GOLD-Kriterien

Abbildung 1.1: Erweiterte Schweregradeinteilung der COPD

Abbildung 2.1: Patienteninformationsblatt

Abbildung 2.2: Einverständniserklärung

Tabelle 3.1: Tabellarische Übersicht der Studienteilnehmer

Abbildung 3.1: Boxplotdarstellung der Thrombozytenzahlen

Abbildung 3.2: Boxplotdarstellung der Serum-BDNF-Konzentrationen

Abbildung 3.3: Boxplotdarstellung der thrombozytären BDNF-Konzentrationen

Abbildung 3.4: Boxplotdarstellung der Serum-TGF-Konzentrationen

Abbildung 3.5: Boxplotdarstellung der Serum-Serotonin-Konzentrationen

Abbildung 3.6: Korrelationsgrafik von BDNF mit Serotonin und TGF

Abbildung 3.7: Korrelationsgrafik von BDNF und TGF mit der Lungenfunktion

Abbildung 3.8: Korrelationsgrafik von thrombozytärer BDNF-Konzentration und
Serum-Serotonin-Konzentrationen mit der Lungenfunktion

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.: Abbildung

BAFF: B-Zellen-aktivierende Faktoren

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

BMI: Body Mass Index

CAT-Score: COPD Assessment Score

CD: Cluster of Differentiation

COPD: Chronisch obstruktive Lungenkrankheit

CRP: C-reaktives Protein

DAMP: Damage-associated molecular-pattern

ECLIPSE: Evaluation of COPD longitudinally to identify predictive surrogate end-points

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EGF: Epidermal growth factor

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

FEV1: Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde der Ausatmung

FVC: Forcierte Vitalkapazität

GOLD: Global Initiative for Obstructive Lung Disease

IL: Interleukin

LABA: Lang wirksames Betasympathomimetikum.

LLN: Lower Limit of Normal

MEF: Maximal Expiratory Flow

MMP: Matrix Metalloproteinasen

mMRC: modified british medical research council

NGF: Nerve growth factor

NT: Neurotrophin

PAMP: Pathogen-associated-molecular pattern

PBS: Phosphate buffer solution

PRR: Pattern recognition receptor

RV: Residualvolumen

Tab.: Tabelle

TGF: Tumor growth factor

TLC: Totale Lungenkapazität

TLCO: Kohlenmonoxid-Transferfaktor

TNF: Tumornekrosefaktor

VA: Alveolarvolumen

VC: Vitalkapazität

WHO: World Health Organization

5-HT: Serotonin (Hydroxytryptamin)

IX. LEBENS LAUF

Aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

X. DANKSAGUNG

Aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

XI. THESEN

1. Die chronische obstruktive Lungenkrankheit (COPD) ist eine Volkserkrankung, deren Prävalenz und gesundheitsökonomische Bedeutung weiter zunimmt. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist jedoch weiterhin nur wenig verstanden.
2. Neben einer chronischen Entzündung kommt es bei der COPD zu einem erheblichen „Remodeling“ der Atemwege, mit Veränderungen der Strukturzellen und der Matrixproteine.
3. Der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) kann nachhaltig die neuronale und muskuläre Funktion regulieren, und wird in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert. Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) ist ebenfalls in Thrombozyten gespeichert, und spielt unter anderem eine Rolle bei der extrazellulären Kollagenablagerung. Die Speicherung von BDNF und TGF- β 1 in Thrombozyten schlägt sich in erheblichen Serumspiegeln dieser Mediatoren beim Menschen nieder.
4. Die Regulation von BDNF und TGF- β 1 im Serum von Patienten mit COPD ist jedoch unbekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die COPD, im Gegensatz zu früher berichteten Befunden bei Asthma bronchiale, mit einer erhöhten Serumkonzentration von TGF- β 1 einhergeht.
5. Wie bei Asthma zeigte sich eine systemische Hochregulierung von BDNF, als möglicher Hinweis auf eine neuromuskuläre Dysfunktion bei der COPD.
6. Die vorliegende Promotionsschrift zeigt, dass ein stadienabhängiger Zusammenhang zwischen den Thrombozytenmediatoren BDNF und TGF- β 1 sowie den Lungenfunktionsparametern besteht, so dass die Mediatoren möglicherweise in unterschiedlichen Stadien eine pathogenetische Rolle spielen.
7. Die Erkenntnisse dieser Arbeit werden zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie des „Remodelings“ der Atemwege bei der COPD beitragen.